REGULATION UND BEEINFLUSSUNG DER NUCLEINSÄURESYNTHESE DER MAGENSCHLEIMHAUT

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Dietmar Müller
aus Genua/Italien

1978

78 536

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Meinen Eltern

in Dankbarkeit

gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Professor Dr. med. K.-Fr. Sewing am Pharmakologischen Institut der Universität Tübingen (Direktor: Prof. Dr. med. M. Siess) durchgeführt.

Herrn Professor Dr. med. K.-Fr. Sewing danke ich für die Überlassung des Themas, insbesondere für die unermüdliche Betreuung bei der Planung, Durchführung und Diskussion der Versuche, nicht zuletzt aber auch für die Motivierung zur wissenschaftlichen Arbeit auf dem Gebiet der theoretischen Medizin.

Diese Arbeit wurde mit freundlicher Unterstützung der Firma Byk Gulden Konstanz durchgeführt.

Tag der mündlichen Prüfung: 2.11.1978

Dekan:	Professor Dr. H. Auterhoff
1. Berichterstatter:	Professor Dr. K.-Fr. Sewing
2. Berichterstatter:	Professor Dr. H.P.T. Ammon

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	METHODIK	4
2.1.	Versuchstiere und Präparation	4
2.1.1.	Gewinnung eines Gesamthomogenats der Magenschleimhaut	4
2.1.2.	Isolierung einer rohen Zellkern-fraktion aus der Magenschleimhaut	7
2.1.3.	Isolierung einer gereinigten Zell-kernfraktion aus der Magenschleimhaut	8
2.2.	Mikroskopische Untersuchung der Zellkernpräparation	9
2.3.	Lagerung der Zellkerne	9
2.4.	Inkubationsbedingungen für die Nucleinsäuresynthese	11
2.4.1.	DNA-Synthese	11
2.4.2.	RNA-Synthese	12
2.5.	Aktivitätsmessung	13
2.6.	Bestimmung der DNA-Konzentration	14
2.7.	Bestimmung des Nucleinsäuregehalts der Magenschleimhaut	15
2.7.1.	Bestimmung des DNA-Gehalts	16
2.7.2.	Bestimmung des RNA-P-Gehalts	16
2.8.	Bestimmung des Proteingehalts der Magenschleimhaut	17
2.9.	Auswaschen des Zellkern-Calciums	18
2.10.	Nahrungsentzug	19
2.11.	Wiederfütterung gehungerter Tiere	19
2.12.	Untersuchung von Nahrungsfaktoren	19

Seite

2.13. Untersuchung von Pentagastrin 20

2.13.1. Untersuchungen an nüchternen Ratten 20

2.13.2. Untersuchungen an gefütterten Meerschweinchen 21

2.13.3. Antrektomie 21

2.13.4. Untersuchung von Pentagastrin an antrektomierten Ratten 22

2.14. Untersuchung ulcerogener Pharmaka 23

2.15. Verwendete Substanzen 23

2.16. Auswertung der Versuchsergebnisse 26

3. ERGEBNISSE 28

3.1. Optimierung der Bedingungen für die DNA- und RNA-Synthese in vitro 28

3.1.1. Temperatur 28

3.1.2. pH 28

3.1.3. Verschiedene Puffersysteme 30

3.1.4. Saccharose- und Elektrolyt-konzentrationen 30

3.1.4.1. Saccharose 30

3.1.4.2. Kalium-Ionen 32

3.1.4.3. Calcium-Ionen 32

3.1.4.4. Magnesium- und Mangan-Ionen 34

3.1.5. Substratsättigung 34

3.1.6. Energiereiches Phosphat 36

3.1.7. Nucleasenhemmung 36

3.1.8. Nucleinsäuresynthese in Abhängigkeit der Zeit 38

Seite

3.1.9. Lagerung der Zellkerne 38

3.1.10. Vergleich der DNA- und RNA-Polymerase-Aktivitäten 38

3.1.11. Hemmbarkeit der Syntheseaktivität 40

3.1.12. Cyclische Nucleotide und 5'-AMP 40

3.2. Untersuchung von Hormonen und Pharmaka in vitro 44

3.2.1. Histamin und H_2-Rezeptorantagonisten 44

3.2.2. Carbenoxolon 47

3.3. Ernährung und Nahrungsfaktoren 48

3.3.1. Nahrungsentzug 48

3.3.2. Wiederfütterung gehungerter Tiere 48

3.3.3. Nahrungsfaktoren 50

3.4. Einfluß von Pharmaka in vivo 55

3.4.1. Pentagastrin 55

3.4.1.1. Untersuchungen an nüchternen Ratten 55

3.4.1.2. Untersuchungen an gefütterten Meerschweinchen 55

3.4.2. Antrektomie 59

3.4.3. Ulcerogene Pharmaka 61

3.4.3.1. Indometacin 61

3.4.3.2. Acetylsalicylsäure 62

3.4.3.3. Phenylbutazon 62

4. DISKUSSION 64

5. ZUSAMMENFASSUNG 81

6. LITERATURVERZEICHNIS 84

1. EINLEITUNG

Die Schleimhaut des Gastrointestinaltrakts unterliegt infolge kontinuierlicher Zellproliferation einer ständigen raschen Erneuerung. Untersuchungen dieses Phänomens wurden bereits 1888 von Bizzozero (6) durchgeführt, doch gelang erst in den letzten 20 bis 30 Jahren durch Verwendung von Tracermethoden ein detaillierterer Einblick in die Zellkinetik. Der gesamte Prozeß der gastrointestinalen Epitheleerneuerung umfaßt die Proliferation, Wanderung, Differenzierung und schließlich das Zugrundegehen der Epithelzellen. Der Beginn dieses Ablaufs ist in bestimmten proliferativen Zonen lokalisiert. Innerhalb dieser Zonen sind undifferenzierte Zellen zur Zellteilung befähigt; im Anschluß an den Teilungsvorgang erfolgt gewöhnlich eine Wanderung in Richtung des gastrointestinalen Lumens, in das sie nach einiger Zeit abgestoßen werden. Während des Wanderungsvorgangs erfolgt im allgemeinen die Zelldifferenzierung, wobei die Fähigkeit zur Teilung verloren geht.

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, daß dieser Zellturnover wesentlich beeinflußt werden kann. So haben beispielsweise Patienten mit Zollinger-Ellison-Syndrom (19), einem Gastrin produzierenden Tumor, eine Hyperplasie und Hypertrophie der Magenschleimhaut, andererseits ist nach Antrektomie eine Atrophie der Mucosa zu beobachten (26). Daher erhob sich die Frage, welche regulatorischen Faktoren in der Lage sind, die Proliferation und Differenzierung der gastorintestinalen Zellen zu beeinflussen. Zellen

reagieren auf eine Stimulation der proliferierenden Aktivität mit der Bildung von RNA und Protein, welche für den Beginn der DNA-Synthese notwendig sind. So konnten Deschner und Lipkin (17) zeigen, daß RNA- und Proteinsynthese in proliferierenden Zellen gegenüber nicht proliferierenden Zellen gesteigert sind. Während des proliferativen Zellcyclus ist eine fortgesetzte Proteinsynthese notwendig; eine Hemmung der Proteinsynthese durch Cycloheximid blockiert demzufolge die Proliferation (4). Der Beginn der DNA-Synthese folgt der Stimulation der Proliferation erst mit einem gewissen Zeitabstand. In vielen Organen konnte auch eine Abhängigkeit der Zelldifferenzierung von der DNA-Synthese nachgewiesen werden. Lipkin (42) sowie Ragins et al. (52) zeigten, daß die DNA-Synthese normalerweise vor der Differenzierung von Magenschleimhautzellen erfolgt. Die Hemmung der DNA-Synthese oder Mitose führt in proliferierenden Intestinalzellen zum Verlust der Differenzierungsfähigkeit und zum Zelluntergang (4, 20). Die Differenzierung selbst geht mit einer Einstellung der DNA-Synthese einher.

Da DNA- und RNA-Synthese für Proliferation und Differenzierung offensichtlich eine wesentliche Rolle spielen, benutzte in den vergangenen Jahren hauptsächlich die Arbeitsgruppe um Johnson die Messung der Nucleinsäuresynthese zur Bestimmung der Zellerneuerungsrate in der Magenschleimhaut (13, 27-34). Dabei konnten für das Magenantrumhormon Gastrin trophische Eigenschaften, gekennzeichnet durch vermehrte DNA-, RNA- und Protein-Synthese, nachgewiesen werden. Die verwendeten Testbedingungen waren je-

doch nicht speziell für die Magenschleimhaut ausgearbeitet worden, was aber notwendig ist, da die Nucleinsäuresynthese verschiedener Gewebe unterschiedliche Eigenschaften aufweisen kann, wie beispielsweise von Mantsavinos und Cannellakis (45) gezeigt wurde.

Da die Nucleinsäuresynthese offenbar vielerlei Regulations- und pharmakologischen Beeinflussungsmöglichkeiten unterliegt, war es wichtig, diese Mechanismen in der Magenschleimhaut im Einzelnen zu untersuchen. Unter diesen Gesichtspunkten lassen sich die Ziele der vorliegenden Arbeit folgendermaßen zusammenfassen:

1. Optimierung der Testbedingungen zur Messung der Nucleinsäuresynthese in der Magenschleimhaut.
2. Einfluß von cyclischen Nucleotiden.
3. Einfluß von Stimulatoren und Inhibitoren der Magensekretion.
4. Regulatorische Funktion von Nahrungsbestandteilen.
5. Rolle von Gastrin und Magenantrum.
6. Einfluß von ulcerogenen Pharmaka.

2. METHODIK

2.1. Versuchstiere und Präparation

Als Versuchstiere wurden verwendet:

1. Weibliche Wistar-Ratten aus dem Stamm FW 49, Biberach, mit einem Gewicht von 250-280 g bei den biochemischen in vitro Versuchen und einem Gewicht von 160-190 g bei den pharmakologischen und ernährungsphysiologischen Versuchen. Wenn nichts anderes angegeben ist, erhielten die Ratten das Trockenfutter "Altromin Nr. 1324" der Fa. Altromin GmbH (Lage/Lippe) und Trinkwasser ad libitum.
2. Männliche Meerschweinchen mit einem Durchschnittsgewicht von ca. 250 g. Sie erhielten Meerschweinchenfutter "Altromin Nr. 3012" der Fa. Altromin, Grünfutter und Karotten, Trinkwasser ad libitum.

Innerhalb einer Versuchsserie wurden nur Tiere gleichen Alters bzw. gleichen Gewichts verwendet.

2.1.1. Gewinnung eines Gesamthomogenats der Magenschleimhaut

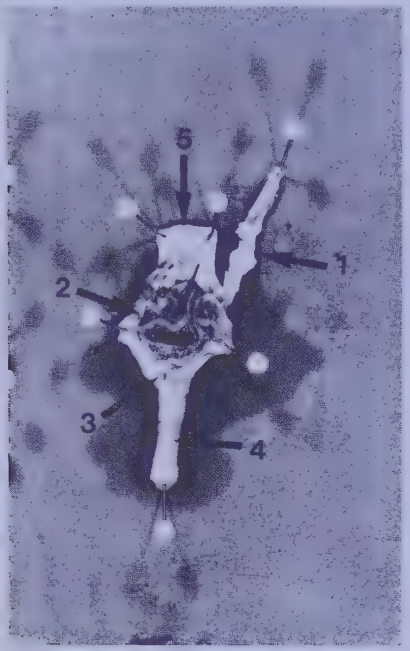
Die Tiere wurden durch Kopfschlag getötet, dekapitiert und ausgeblutet. Das Abdomen wurde durch einen Medianschnitt eröffnet, der Magen nach Durchtrennung des Oesophagus nahe am Mageneingang und des Duodenums nahe am

Pylorus entnommen und sofort in eiskalte physiologische Kochsalzlösung gelegt.

Nachfolgende Arbeiten wurden im Kühlraum bei 4°C durchgeführt:

Der Magen wurde entlang der kleinen Kurvatur geöffnet und vom Mageninhalt befreit. Nach dem Waschen des Magens in eiskalter physiologischer Kochsalzlösung wurde er mit Stecknadeln auf ein Präparierbrett gespannt und durch leichtes Betupfen mit Zellstoff abgetrocknet (Abb. 1 und 2). Fundus- oder Antrum-Schleimhaut wurde mit Hilfe eines angeschliffenen Spatels abgeschabt (bei Ratten wurde ausschließlich mit Fundus-Mucosa gearbeitet). Zunächst wurde das Gewebe in ca. 5 ml "Puffer 1" (Saccharose 0,25 mol/l, KCl 0,025 mol/l, $MgCl_2$ 0,001 mol/l, gelöst in "Natriumacetat/hydrogencarbonat-Lösung pH 7,5": CH_3COONa 0,01 mol/l, mit $NaHCO_3$ auf pH 7,5 eingestellt) mit einem "Ultraturrax" unter Eiskühlung grob zerkleinert (fünfmaliges kurzes Einschalten des Gerätes). Der Gewebebrei wurde in einen 10 ml-Potter-Homogenisator übergeführt, wobei mit 1-2 ml "Puffer 1" nachgespült wurde. Mit einem Teflonstempel wurde unter Eiskühlung durch je zehn langsame Auf- und Abbewegungen bei ca. 110 rpm homogenisiert. Das Homogenat wurde zur Abtrennung größerer Gewebepartikel nacheinander durch eine vierfache und sechsfache Lage Mull filtriert.

Bei Inkubation des Gesamthomogenats wurde der Arbeitsvorgang nach der zweiten Filtration abgebrochen; als Homogenisationsmedium wurde in diesem Falle "Medium A" für die DNA-Synthese oder "Medium B" für die RNA-Synthese ver-



(1) Oesophagus
(2) Fundus
(3) Antrum
(4) Duodenum
(5) Rumen

Abb. 1: Rattenmagen
etwa 3/4 natürl. Größe

Abb. 2: Meerschweinchenmagen
etwa 3/4 natürl. Größe

wendet. Die Zusammensetzung der Medien und die Inkubationsbedingungen sind unter 2.4. angegeben.

Gesamthomogenate der Fundusschleimhaut des Ratten- und Meerschweinchenmagens wurden zur Untersuchung von Hormonen und Pharmaka in vitro verwendet (3.2.).

2.1.2. Isolierung einer rohen Zellkernfraktion aus der Magenschleimhaut

Das Filtrat des in "Puffer 1" homogenisierten Gewebes wurde zu gleichen Teilen auf zwei Zentrifugenröhrchen verteilt und in einer "Sorvall-Zentrifuge" 7 min bei 700 x g zentrifugiert; der Überstand wurde abgegossen.

Zur Messung der Nucleinsäuresynthese in der rohen Zellkernfraktion wurde der Isolationsvorgang hier abgebrochen. Für die Inkubationsbedingungen gelten die Angaben unter 2.4.

Rohe Zellkernfraktionen der Fundusschleimhaut des Rattenmagens wurden zur Untersuchung der Ernährung und Nahrungsfaktoren (3.3.) sowie der Einflüsse von Pharmaka in vivo (3.4.1.1., 3.4.2., 3.4.3.) verwendet. Rohe Zellkernfraktionen der Fundus- und Antrumschleimhaut des Meerschweinchenmagens wurden zur Untersuchung von Pentagastrin am gefütterten Meerschweinchen verwendet (3.4.1.2.).

2.1.3. Isolierung einer gereinigten Zellkernfraktion aus der Magenschleimhaut

Die in den Zentrifugenröhrchen verbliebenen Pellets wurden in 2 ml "Puffer 1" resuspendiert und in einen 5 ml-Potter-Homogenisator übergeführt, wobei mit 1 ml "Puffer 1" nachgespült wurde. Die rohe Kernfraktion wurde durch je fünf langsame Auf- und Abbewegungen mit einem Teflonstempel bei 110 rpm unter Eiskühlung nachhomogenisiert, um noch anhaftende cytoplasmatische Partikel abzutrennen. Das Homogenat wurde zu gleichen Teilen auf zwei Zentrifugenröhrchen mit einem Durchmesser von 1,5 cm verteilt und mit je 4 ml "Puffer 2" (Saccharose 0,34 mol/l, $MgCl_2$ 0,001 mol/l, Dextransulfat 100 µg/ml, gelöst in "Natriumacetat/hydrogencarbonat-Lösung pH 7,5") unterschichtet. Der Gradient wurde 15 min bei 1 100 x g in einer "Sorvall-Zentrifuge" zentrifugiert. Der Überstand mit den darin befindlichen nicht sedimentierten Partikeln wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt, die Pellets wurden wie oben beschrieben in "Puffer 1" resuspendiert und durch je 2-3 sehr langsame Auf- und Abbewegungen homogenisiert. Nach Herstellung des angegebenen Gradienten wurde nochmals 15 min bei 1 100 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abgesaugt und die Innenwand der Zentrifugenröhrchen mit Filterpapier getrocknet.

Bei Verwendung von Meerschweinchenmägen ist es infolge der sehr schleimigen Konsistenz der Mucosa notwendig, bei den Zentrifugationen die Umdrehungszahl um 250 bis 500 rpm

zu erhöhen, um eine bessere Sedimentation der Zellkerne zu erzielen.

Zur Optimierung der Bedingungen für die DNA- und RNA-Synthese in vitro wurden gereinigte Zellkernfraktionen der Fundusschleimhaut des Rattenmagens verwendet (3.1.).

2.2. Mikroskopische Untersuchung der Zellkernpräparation

In den Voruntersuchungen zur Entwicklung der Zellkernisolation wurde jede einzelne Stufe der Präparation mikroskopisch untersucht, um die relative Reinheit und Integrität der Zellkerne zu prüfen (Abb. 3).

2.3. Lagerung der Zellkerne

Es wurden verschiedene Methoden zur Konservierung der Zellkerne getestet:

1. Lagerung bei 4°C
2. Lagerung bei -20°C
3. Lyophilisation

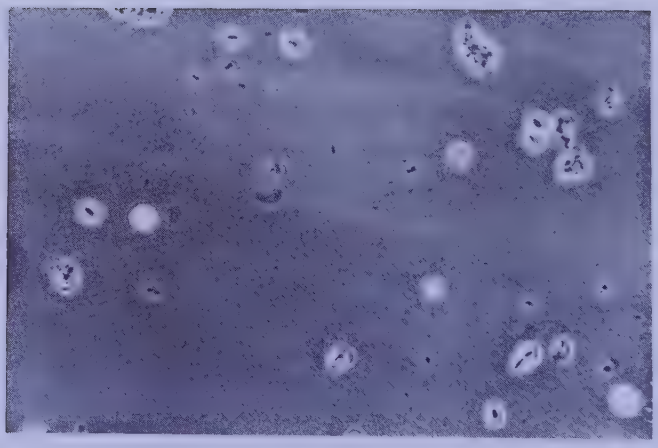


Abb. 3: Gereinigte Zellkernfraktion der Fundusschleimhaut des Rattenmagens (Phasenkontrast).

2.4. Inkubationsbedingungen für die Nucleinsäuresynthese

Die Inkubationen erfolgten unmittelbar nach der Präparation der Zellkerne. Von den beiden unter 2.1.2. bzw. 2.1.3. erhaltenen Pellets wurde eines mit 0,5 ml "Medium A" (s.u.) und eines mit 0,3 ml "Medium B" (s.u.) suspendiert.

2.4.1. DNA-Synthese

Unter Eiskühlung wurden folgende Lösungen in 1,5 ml-"Eppendorf-Gefäße" zueinander pipettiert:

100 µl	(6-^{3}H)Thymidin (5,0 Ci/mmol), gelöst in Aqua bidest. (6,0 µCi/ml), woraus sich eine Radioaktivität von 1,2 µCi/ml Inkubationslösung ergibt
300 µl	"Medium A" (Endkonzentrationen im Inkubationsmedium: Saccharose 0,2 mol/l, KCl 0,025 mol/l, $CaCl_2$ 0,005 mol/l, $MgCl_2$ 0,0001 mol/l, Dextransulfat 100 µg/ml, gelöst in "Natriumacetat/hydrogencarbonat-Lösung pH 7,5")
100 µl	Kernsuspension in "Medium A"

Nach kurzem Durchmischen des Inkubationsansatzes wurden die Proben, wenn nicht anders angegeben, 1 h bei 37°C in

einem thermostatisierten Schüttelbad inkubiert. Die Inkubation wurde durch Eiskühlung und Zusatz von 0,8 ml thymidinhaltiger (5 mmol/l) kalter 0,4 N Perchlorsäure abgestoppt. Die Proben blieben bis zur weiteren Aufarbeitung mindestens 30 min in Eis stehen.

2.4.2. RNA-Synthese

Unter Eiskühlung wurden folgende Lösungen in 1,5 ml-"Eppendorf-Gefäße" zueinander pipettiert:

50 µl	(6-^{3}H)Uridin (16,3 Ci/mmol), gelöst in Aqua bidest. (45,0 µCi/ml), woraus sich eine Radioaktivität von 9 µCi/ml Inkubationslösung ergibt
150 µl	"Medium B" (Endkonzentrationen im Inkubationsmedium: Saccharose 0,15 mol/l, $CaCl_2$ 0,0005 mol/l, $MgCl_2$ 0,0001 mol/l, $MnCl_2$ 0,00001 mol/l, Dextransulfat 100 µg/ml, gelöst in "Natriumacetat/hydrogencarbonat-Lösung pH 7,5")
50 µl	Kernsuspension in "Medium B"

Wurden ^{3}H-Uridin-Lösungen mit einer höheren spezifischen Aktivität vom Hersteller geliefert, so wurde der ^{3}H-

Uridin-Lösung eine entsprechende Menge unmarkierten Uridins zugesetzt, so daß Radioaktivität und Uridin-Konzentration im Inkubationsansatz immer gleich blieben. Der Inkubationsvorgang ist mit dem bei der DNA-Synthese beschriebenen identisch. Das Abstoppen erfolgte durch Eiskühlung und Zusatz von 0,4 ml uridinhaltiger (5 mmol/l) kalter 0,4 N Perchlorsäure.

Zur Herstellung der "Natriumacetat/hydrogencarbonat-Lösung pH 7,5" wurde destilliertes, zur Abtötung von Mikroorganismen einige Minuten lang zum Sieden erhitztes Wasser verwendet; die Lösung wurde bei 4°C verschlossen aufbewahrt. Die hergestellten Medien wurden ebenfalls bei 4°C aufbewahrt und mindestens alle 14 Tage frisch hergestellt, um eine Kontamination mit Mikroorganismen zu verhindern. Bei der Herstellung und Verwendung der Lösungen wurde auf eine keimarme Arbeitsweise geachtet.

2.5. Aktivitätsmessung

Die abgestoppten Inkubationsansätze wurden im Kühlraum in einer "Zentrifuge 3 200" der Fa. Eppendorf 2 min zentrifugiert und die Überstände mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt. Die Sedimente wurden mit je 1 ml eiskalter 0,2 N Perchlorsäure resuspendiert und in Eis gestellt. Anschließend wurde wieder abzentrifugiert und der Waschvorgang wiederholt.

Die gewaschenen Kerne wurden mit je 0,5 ml einer Mischung aus 35 ml "Soluene 350" und 65 ml Isopropylalkohol (Aufbewahrung der Mischung bei 4°C, vor Licht geschützt) versetzt und bei 50°C im thermostatisierten Wasserbad unter wiederholtem Aufwirbeln der Pellets inkubiert. Nach völliger Auflösung des Sediments wurden die auf Zimmertemperatur erkalteten Proben mit einer Pasteur-Pipette in jeweils 10 ml Toluolscintillator (5,0 g PPO, 0,0625 g Dimethyl-POPOP, 1 l Toluol) pipettiert. Die Messung der Radioaktivität erfolgte in einem "Isocap 300 Liquid Scintillation System" der Fa. Nuclear, Chicago. Die Aktivität der DNA- und RNA-Polymerasen wurde in cpm/µg DNA angegeben.

2.6. Bestimmung der DNA-Konzentration

DNA wurde nach der von Burton (10) entwickelten Diphenylamin-Methode mit den von Giles und Myers (24) angegebenen Modifizierungen bestimmt: 100 µl Kernsuspension bzw. Gesamthomogenat in "Medium A" oder "Medium B" wurden in einem kleinen Zentrifugenglas mit 3,0 ml 10 % Perchlorsäure versetzt und im Wasserbad 30 min bei 70°C unter gelegentlichem Umschwenken inkubiert. Nach Erkalten auf Zimmertemperatur wurde 20 min bei 2 000 rpm in einer "Heraeus-Christ-Zentrifuge, Typ UJ3E" zentrifugiert und durch ein Rundfilter der Fa. Macherey-Nagel + Co. "MN 1674" filtriert. 2,0 ml des Filtrats wurden mit 2,0 ml einer Lösung von 4 % Diphenylamin in Eisessig und 100 µl wässriger Acet-

aldehyd-Lösung (1,6 mg/ml) versetzt und 18 h bei 30°C inkubiert. Die photometrische Messung des gebildeten blauen Farbstoffs erfolgte bei 595 und 700 nm gegen den Leerwert. Die DNA-Konzentration pro ml Lösung ergab sich aus der Differenz $E_{595nm} - E_{700nm}$ anhand einer Eichkurve, die unter Verwendung von Kalbsthymus-DNA erstellt worden war. Multiplikation der pro ml Lösung ermittelten DNA-Konzentration mit dem Faktor 3 ergab den DNA-Gehalt pro 100 µl Kernsuspension bzw. Gesamthomogenat.

Das Diphenylamin-Reagenz wurde vor Licht geschützt, die Acetaldehyd-Lösung bei 4°C aufbewahrt.

2.7. Bestimmung des Nucleinsäuregehalts der Magenschleimhaut

Die Aufarbeitung des Gewebes und die Trennung von Desoxyribonucleinsäure und Ribonucleinsäure erfolgte nach der Schmidt-Thannhauser-Methode (55) mit den von Munro und Fleck (49) angegebenen Verbesserungen:

300 - 500 mg Magenschleimhaut wurden mit 5,0 ml eiskaltem destilliertem Wasser homogenisiert. 1,0 ml des Homogenats wurde in einem Zentrifugenglas mit 0,5 ml eiskalter 0,6 N Perchlorsäure versetzt und sorgfältig gemischt, einige Minuten in Eis gestellt und anschließend 10 min in einer "Sorvall-Zentrifuge" bei 1 000 x g zentrifugiert. Die überstehende (säurelösliche) Fraktion wurde verworfen

und der Niederschlag zwei mal mit je 2 ml 0,2 N Perchlorsäure gewaschen. Die Innenseite des Zentrifugenglases wurde mit Filterpapier getrocknet, der Niederschlag mit 4,0 ml 0,3 N Kalilauge versetzt und 90 min bei 37°C inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurde die Probe in Eis gekühlt, mit 2,5 ml 1,2 N Perchlorsäure gemischt und 10 min in Eis stehen gelassen. Anschließend wurde 10 min bei 1 000 x g zentrifugiert und zwei mal mit je 2,0 ml 0,2 N Perchlorsäure gewaschen.

2.7.1. Bestimmung des DNA-Gehalts

Das nach dem Waschvorgang übriggebliebene protein- und DNA-haltige Sediment wurde mit 5,0 ml 10 % Perchlorsäure versetzt und analog der unter 2.6. beschriebenen Methode zur DNA-Bestimmung weiterverarbeitet. Die Gesamt-DNA-Menge in dieser Lösung entspricht der DNA-Konzentration in 1,0 ml Ausgangshomogenat.

2.7.2. Bestimmung des RNA-P-Gehalts

Die Bestimmungsmethode beruht auf der Messung des RNA-Phosphors. Die vereinigten Überstände des Sediments wurden mit destilliertem Wasser auf 25,0 ml verdünnt, und die Extinktion dieser Lösung wurde bei 260 und 232 nm gegen

0,1 N Perchlorsäure gemessen. Nach der von Fleck und Begg (22) angegebenen Formel wurde der RNA-P-Gehalt in µg/ml Lösung berechnet:

$$C_{RNA\text{-}P} = 3{,}40\ E_{260nm} - 1{,}44\ E_{232nm}$$

Die RNA-P-Konzentration in 25,0 ml Probelösung entspricht der RNA-P-Konzentration in 1,0 ml Ausgangshomogenat.

2.8. Bestimmung des Proteingehalts der Magenschleimhaut

0,5 ml des Magenschleimhauthomogenats in eiskaltem destilliertem Wasser (s. 2.7.) wurden mit 14,5 ml destilliertem Wasser gemischt und 0,5 ml dieser Mischung zur Proteinbestimmung in Anlehnung an die Methode von Lowry et al. (43) verwendet:

Reagenzien:

1. "Lösung I":
   Es wurden frisch gemischt: 0,5 ml Kaliumnatriumtartrat-Lösung (2,7 g $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4\ H_2O$/100 ml), 0,5 ml Kupfersulfat-Lösung (1,0 g $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$/100 ml) und 49,0 ml Natriumcarbonat-Lösung (19,64 g Na_2CO_3/1000 ml).
2. "Lösung II":
   Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (MERCK) wurde mit Wasser 1:1 verdünnt.

3. 1 N Natronlauge

Durchführung:

0,5 ml Probe, 0,5 ml 1 N Natronlauge und 5,0 ml "Lösung I" wurden gemischt und 10 min stehen gelassen. Unter kräftigem Schütteln wurden in kleinen Teilen 0,5 ml "Lösung II" zugegeben und nach 30 min die Extinktion bei 750 nm gegen den Leerwert gemessen. Aus einer Eichkurve mit Rinderserumalbumin-Lösung wurde die Protein-Konzentration in µg/ml ermittelt.

2.9. Auswaschen des Zellkern-Calciums

Das Sediment nach der 700 x g - Zentrifugation (2.1.2.) wurde mit 10 ml EDTA (10^{-4} mol/l) in calcium- und magnesiumfreiem "Medium A" bzw. "Medium B" suspendiert und unter wiederholtem Schütteln 10 min in Eis stehen gelassen. Anschließend wurde 10 min bei 1 000 x g zentrifugiert und der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe vorsichtig abgesaugt. Zur Entfernung von noch vorhandenem EDTA wurde nach Resuspendieren des Pellets in 10 ml "Puffer 1" und zehnminütigem Stehen in Eis bei 1 000 x g zentrifugiert. Das Kernsediment wurde wie oben beschrieben weiterbehandelt und zur Inkubation verwendet.

2.10. Nahrungsentzug

Ratten hatten während der Hungerperiode freien Zugang zu Trinkwasser. Nach 8, 16 oder 24 h wurden sie jeweils um 7 Uhr morgens getötet und DNA- und RNA-Synthese der Fundusmucosa des Magens und zum Vergleich nach 16 h auch im Jejunum und in der Niere bestimmt.

2.11. Wiederfütterung gehungerter Tiere

48 h nach Nahrungsentzug wurde den Ratten wieder eine Nahrungsaufnahme ermöglicht und nach verschiedenen Zeitabständen die Polymerasenaktivität der Fundusmucosa gemessen.

2.12. Untersuchung von Nahrungsfaktoren

Die Wirkung einzelner Nahrungsfaktoren auf die Nucleinsäuresynthese der Fundusmucosa wurde so untersucht, daß Ratten die einzelnen Hauptnahrungsbestandteile Protein, Kohlehydrate und Fett allein oder in verschiedenen Kombinationen 16 h vor Versuchsbeginn anstelle der normalen "Altromin"-Nahrung bekamen. Der Thymidin- und Uridin-Einbau wurde mit dem normal gefütterter Tiere verglichen. Als Proteinkomponente wurde ein aus Casein enzymatisch abgebautes Pepton verwendet, der Kohlenhydratanteil bestand aus je zehn

Teilen Saccharose, Glucose, Kartoffelstärke, Galactose und Maltose, sowie je 0,5 Teilen Glycogen und Mannose, als Fettkomponente wurde Olivenöl verwendet, als Ballaststoff diente in allen Nahrungskompositionen gereinigte Cellulose.

Zur Untersuchung des Einflusses von Nahrungselektrolyten auf die Nucleinsäuresynthese der Magenschleimhaut wurde eine Standardfuttermischung verwendet, die aus dem energetisch inerten Psyllium (pflanzlicher Quellstoff), Protein, Kohlenhydraten und Fett im Verhältnis 27:28:28:14 bestand und einen Energiegehalt von 1 463 kJ/100 g hatte.

2.13. Untersuchung von Pentagastrin

2.13.1. Untersuchungen an nüchternen Ratten

Die Tiere wurden bei freiem Zugang zu Wasser 48 h nüchtern gehalten und während dieser Zeit dreimal täglich mit jeweils 200 µg Pentagastrin/kg Körpergewicht i.p. behandelt. Die Kontrolltiere erhielten entsprechende Mengen physiologischer Kochsalzlösung. 8 h nach der letzten Injektion wurden die Tiere getötet und die Nucleinsäuresynthese gemessen.

2.13.2. Untersuchungen an gefütterten Meerschweinchen

Normal gefütterte Meerschweinchen wurden drei Tage lang mit drei mal täglich 50 µg Pentagastrin/kg Körpergewicht s.c. behandelt. Das Pentagastrin war in Gelatine gelöst. Die Kontrolltiere bekamen das reine Lösungsmittel verabreicht. 8 h nach der letzten Injektion wurden die Tiere getötet und die Nucleinsäuresynthese der Magenschleimhaut untersucht.

2.13.3. Antrektomie

Ca. 12 h nüchternen Tieren wurde in Hexobarbitalnarkose (100 mg/kg Körpergewicht i.p.) durch einen medianen Längsschnitt das Abdomen geöffnet. Der Magen wurde entlang der kleinen und großen Kurvatur im Bereich des Antrums skelettiert. Nach Durchtrennung der Magen-Duodenumgrenze in Höhe des Sphincter Pylori wurde das Duodenum ligiert und der Stumpf durch drei bis vier Serosanähte versenkt. Anschließend wurde das Antrum an der Grenze zum Fundus abgetrennt. Durch mehrere Mucosa- und Serosanähte wurde eine kleine Kurvatur wiederhergestellt. Die Anlage einer End- zu Seitanastomose wurde in der Form vorgenommen, daß die verbliebene Öffnung des Magens mit dem ca. 1,5 - 2 cm distal vom Sphincter Pylori an der mesenteriumfreien Seite in ca. 1 cm Länge eröffneten Duodenum zweischichtig vernäht wurde. Nach Spülung des Abdomens mit physiologischer Kochsalzlö-

sung und intraabdominaler Injektion von 100 mg Ampicillin wurde das Abdomen zweischichtig (Peritoneum + Muskel + Fascie und Haut) vernäht. Zur Flüssigkeitssubstitution wurden unmittelbar nach der Operation 2 ml physiologischer Kochsalzlösung s.c. und zur Hemmung der Magensekretion ca. 5 h nach der Operation 4 mg Cimetidin s.c. injiziert. Die postoperative Nachsorge geschah in der Form, daß den Tieren in den ersten 24 h gesüßte Ringerlösung und anschließend zunehmend feste Nahrung angeboten wurde. Die Tiere wurden frühestens 8 Wochen nach der Operation in den Versuch genommen. Scheinoperierten Tieren wurde das Abdomen in der beschriebenen Weise eröffnet und wieder verschlossen.

2.13.4. Untersuchung von Pentagastrin an antrektomierten Ratten

Normal gefütterte antrektomierte Ratten wurden drei Tage lang mit drei mal täglich 250 µg/kg Pentagastrin i.p. behandelt. Als Kontrolltiere wurden scheinoperierte Ratten in entsprechender Weise mit physiologischer Kochsalzlösung behandelt. 8 h nach der letzten Injektion wurden die Tiere getötet und die Nucleinsäuresynthese der Magenschleimhaut gemessen.

2.14. Untersuchung ulcerogener Pharmaka

Die zu untersuchende Substanz wurde den Ratten als Suspension in 0,5 % Traganthschleim per Schlundsonde zweimal täglich über einen Behandlungszeitraum von drei Tagen verabreicht. Die Kontrolltiere erhielten das reine Suspensionsmittel, 9 h nach der letzten Pharmakongabe wurden die Tiere getötet und die Nucleinsäuresynthese der Magenschleimhaut gemessen.

2.15. Verwendete Substanzen

Acetylsalicylsäure	DAB-Ware
Adenosin-3',5'-phosphat cyclisch reinst	SERVA
Adenosin-5'-phosphat·Na_2-salz · 6 H_2O p.a.	SERVA
Carbenoxolon Dinatriumsalz	Chemiewerk Homburg
Cellulose-TLC reinst	SERVA
Cimetidin	Smith Kline, Dauelsberg GmbH & Co.

Desoxyribonucleinsäure aus Kälberthymus, lyophil. reinst	SERVA
Dextransulfat Natriumsalz	PHARMACIA FINE CHEMICALS AB Uppsala, Schweden
Dimethyl-POPOP	MERCK
Diphenylamin p.a.	MERCK
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz	MERCK
D(+)-Galactose reinst	MERCK
Gelatine "CALCITONIN DILUENT B"	ARMOUR PHARMACEUTICAL COMPANY, USA
D(+)-Glucose wasserfrei	MERCK
Glycogen für biochemische Zwecke	MERCK
Guanosin-3',5'-phosphat cycl. reinst	SERVA
Histamindihydrochlorid	MERCK
Indometacin	Sharp & Dohme
Kartoffelstärke	DAB-Ware
Maltose(Monohydrat) krist.	MERCK

D(+)-Mannose für biochem. Zwecke	MERCK
Metiamid	Smith Kline, Dauelsberg GmbH & Co
Mitomycin C rein	SERVA
Olivenöl	DAB-Ware
Pentagastrin	MERCK
Pepton aus Casein C/ELP enzymat. abgebaut	SERVA
Phenylbutazon	MERCK
PPO	MERCK
Psyllium	Kneipp-Heilmittelwerke
Saccharose reinst	MERCK
Soluene-350	Packard
Theophyllin krist. rein	MERCK
Thymidin p.a.	SERVA
(6-^{3}H)Thymidin, spez. Akt. 5,0 Ci/mmol	The Radiochemical Centre Amersham
Toluol dest.	ARAL
Traganth	DAB-Ware

Uridin krist. p.a.	SERVA
(6-^{3}H)Uridin, spez. Akt. 16,3; 20,4; 21,9 Ci/mmol	The Radiochemical Centre Amersham

2.16. Auswertung der Versuchsergebnisse

Jeder Einzelwert eines Versuchs resultiert aus einer Dreifachbestimmung (Durchschnittswert dreier Inkubationsansätze). Aus den Einzelwerten wurden die Mittelwerte mit mittlerer Abweichung der Mittelwerte berechnet (Anzahl der Einzelwerte = N).

Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde nach Student's t-Test für den zweiseitigen Test bestimmt, wobei ein Ergebnis als signifikant angesehen wurde, wenn $p < 0{,}05$ war.

Bei Versuchsserien, die über längere Zeit durchgeführt wurden, variierte die Aktivität der Nucleinsäuresynthese bisweilen stark. Daher wurde hier jeden Tag eine Kontrolle mitgeführt, deren Aktivität mit 100 % angenommen wurde, wodurch sich die Aktivität der anderen Proben in % berechnen ließ. Der t-Wert für diese Art der Versuchsanordnung wurde errechnet nach:

$$\frac{\bar{x} - 100}{s_{\bar{x}}}$$

wobei FG = $N_{(\bar{x})} - 1$

$\bar{x}$ = Mittelwert der Einzelwerte in %

$s_{\bar{x}}$ = Mittlere Abweichung des Mittelwerts

3. E R G E B N I S S E

3.1. Optimierung der Bedingungen für die DNA- und RNA-Synthese in vitro

3.1.1. Temperatur

Die DNA- und RNA-Synthese waren bei 37°C am höchsten (Abb. 4). Die DNA-Synthese schien gegenüber höheren Temperaturen besonders empfindlich zu sein. Eine Temperaturerhöhung um 5°C auf 42°C senkte die Syntheserate auf 36,9 %, während bei Temperaturerniedrigung um 5°C auf 32°C noch eine Aktivität von 87,3 % erhalten war. Erst bei 22°C sank der Thymidin-Einbau auf 44,6 %. Die RNA-Synthese schien auf Temperaturerhöhung und -senkung gleichermaßen zu reagieren. Eine Änderung um 5°C nach oben oder unten senkte die Uridin-Einbaurate um ca. 20 %.

3.1.2. pH

Das pH-Optimum für den Thymidin- und Uridin-Einbau lag im Bereich der intrazellulären pH-Werte. Die DNA-Synthese hatte ihr Maximum bei pH 7,45, die RNA-Synthese bei 7,3 (Abb. 5). Die Syntheserate beider Nucleinsäuren wurde durch zunehmend alkalisches Milieu stärker beeinträchtigt als durch zunehmend saures.

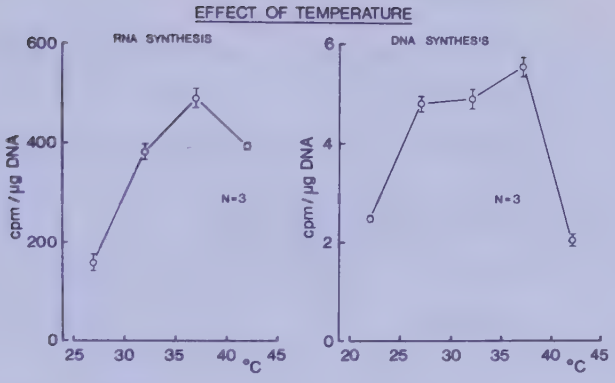


Abb. 4: Temperaturabhängigkeit der Nucleinsäuresynthese der Fundusschleimhaut des Rattenmagens.
Werte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

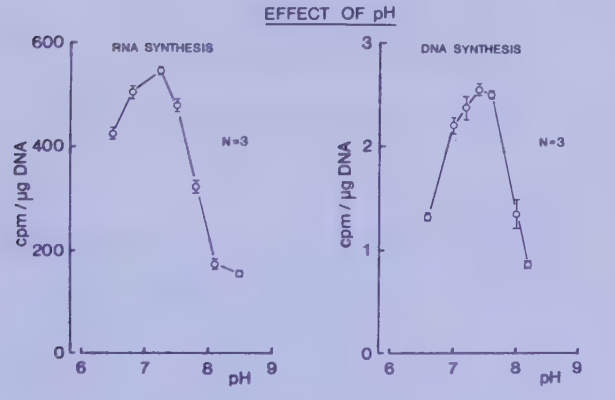


Abb. 5: pH-Abhängigkeit der Nucleinsäuresynthese der Fundusschleimhaut des Rattenmagens.
Werte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

3.1.3. Verschiedene Puffersysteme

Nachdem das pH-Optimum für die Nucleinsäuresynthese der Magenschleimhaut ermittelt war, wurde geprüft, ob der pH-Wert des Puffersystems der allein ausschlaggebende Faktor für eine maximale Synthese ist oder ob auch die chemische Zusammensetzung des Puffers einen Einfluß besitzt. Daher wurde die DNA-Synthese in verschiedenen Puffersystemen mit einem pH von jeweils 7,5 untersucht. Die Konzentration der Puffersubstanz war in allen Lösungen 5 mmol/l.

Die besten Werte wurden mit einer Mischung aus Natriumacetat und Natriumhydrogencarbonat erzielt; nur wenig schlechter war ein Puffersystem aus KH_2PO_4/Na_2HPO_4. Deutlich niedriger war der Thymidin-Einbau in Inkubationsmedien mit Triaethanolamin-HCl/NaOH- und Tris-Puffer (Abb. 6).

3.1.4. Saccharose- und Elektrolytkonzentrationen

3.1.4.1. Saccharose

Das Konzentrationsoptimum der Saccharose lag für die RNA-Synthese bei 150, für die DNA-Synthese bei 200 mmol/l (Abb. 7 und 8). Das Wirkspektrum war in beiden Fällen sehr breit.

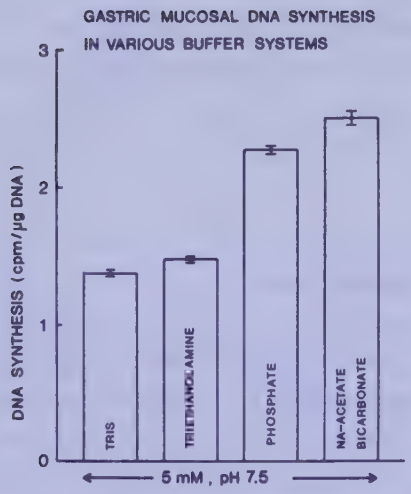


Abb. 6: Einfluß verschiedener Puffersysteme auf die DNA-Synthese der Fundusschleimhaut des Rattenmagens. N = 4, Werte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

3.1.4.2. Kalium-Ionen

Bei der Untersuchung des Einflusses von K^+ zeigte sich ein grundsätzlicher Unterschied zwischen DNA- und RNA-Synthese. K^+ wirkte sich in einem Bereich von 5 - 50 mmol/l auf die DNA-Synthese stimulierend aus; höhere Konzentrationen (100 mmol/l) wirkten hemmend (Abb. 7). Die RNA-Synthese nahm schon bei niedrigen K^+-Dosen konzentrationsabhängig ab (Abb. 8).

3.1.4.3. Calcium-Ionen

Calcium hatte auf die Synthese beider Nucleinsäuren einen fördernden Einfluß. Das Wirkspektrum war bei der DNA-Synthese wesentlich breiter als bei der RNA-Synthese. Das Optimum der Ca^{2+}-Konzentration lag für den Thymidin-Einbau bei 5 mmol/l, während bei 10 mmol/l langsam ein Hemmeffekt eintrat (Abb. 7). Das Optimum für den Uridin-Einbau lag etwa eine Zehnerpotenz niedriger, nämlich im Bereich von 0,5 mmol/l. Eine Erhöhung des Calcium-Gehalts auf 5 mmol/l senkte die RNA-Synthese um 26,2 % (Abb. 8).

In einer weiteren Versuchsserie wurden EDTA-behandelte Zellkerne zum einen Teil in calciumfreiem, zum anderen Teil in calciumhaltigem "Medium A" bzw. "Medium B" inkubiert. Der Thymidin-Einbau wurde durch Calcium in einer Konzentration von 2,5 mmol/l um 105,2 % gegenüber der calciumfreien Kontrolle gesteigert, der Uridin-Einbau durch eine Konzen-

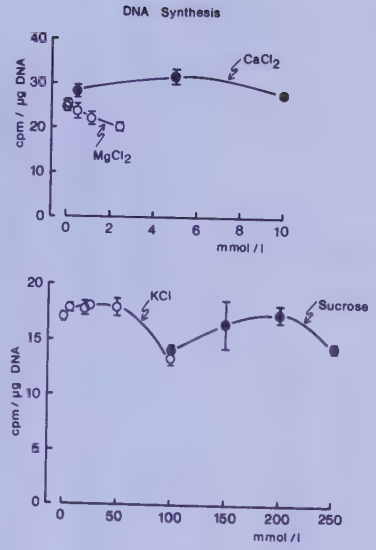


Abb. 7:
Einfluß von Saccharose und Elektrolyten auf die DNA-Synthese der Fundusschleimhaut des Rattenmagens.
N=3, Werte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

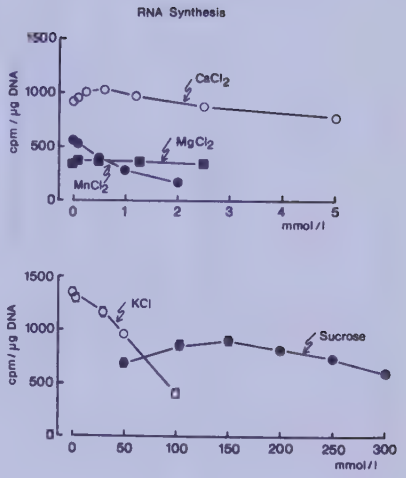


Abb. 8:
Einfluß von Saccharose und Elektrolyten auf die RNA-Synthese der Fundusschleimhaut des Rattenmagens.
N=3, Werte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

zentration von 0,08 mmol/l um 71,9 % (Abb. 9).

3.1.4.4. Magnesium- und Mangan-Ionen

Magnesium hatte auf die DNA-Synthese in einer Konzentration von 0,1 mmol/l einen positiven Einfluß (Abb. 7); in der gleichen Konzentration förderte es auch den Uridin-Einbau in die RNA (Abb. 8). Hier besaß auch Mangan in einer Konzentration von 0,01 mmol/l stimulierende Effekte (Abb. 8). Verglichen mit der DNA-Synthese reagierte die RNA-Synthese auf Erhöhung der Magnesium-Konzentration weniger empfindlich. Eine Erhöhung des Magnesium-Gehalts auf 2,5 mmol/l hatte eine Senkung des Thymidin-Einbaus um 20,5 % zur Folge, während der Uridin-Einbau nur um 5,5 % abnahm.

3.1.5. Substratsättigung

Um sicherzustellen, daß auch bei einer massiven Steigerung der Nucleinsäuresynthese ausreichende Mengen an Substrat zur Verfügung stehen, mußte für die späteren Routinemessungen der Bereich der Substratsättigung ermittelt werden.

Die DNA-Synthese nahm im Bereich von 0 bis $1,5 \times 10^{-7}$ mol/l Substrat und die RNA-Synthese im Bereich von 0 bis

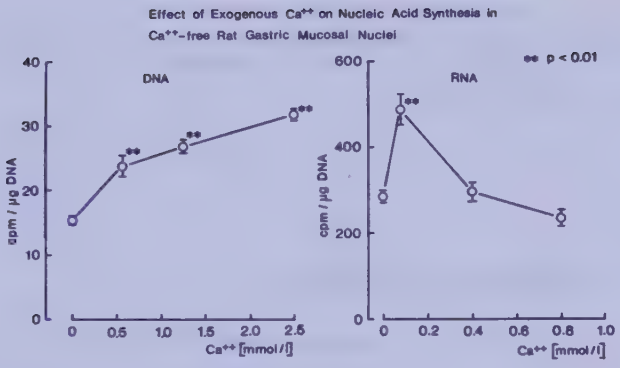


Abb. 9: Einfluß von Calcium auf die Nucleinsäuresynthese der Fundusschleimhaut des Rattenmagens nach Behandlung der Zellkerne mit EDTA. N=4, Werte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

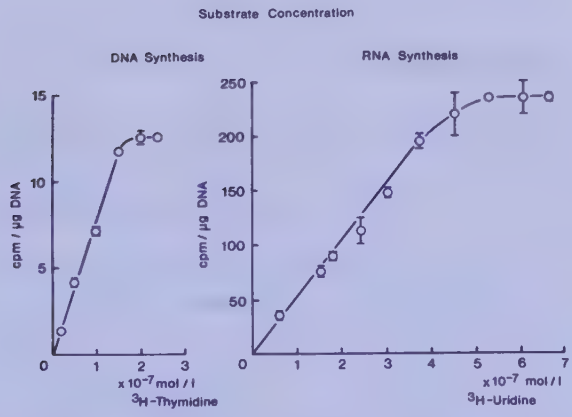


Abb. 10: Abhängigkeit der Nucleinsäuresynthese der Fundusschleimhaut des Rattenmagens von der Substratkonzentration. N=3, Werte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

$4,6 \times 10^{-7}$ mol/l Substrat linear zu. Eine Substratsättigung war für die DNA-Synthese im Bereich von $2,0 \times 10^{-7}$ mol/l ^{3}H-Thymidin und für die RNA-Synthese von $6,1 \times 10^{-7}$ mol/l ^{3}H-Uridin gegeben (Abb. 10).

3.1.6. Energiereiches Phosphat

Die DNA-Synthese war gegenüber ATP in den getesteten Konzentrationen (10^{-5} bis 10^{-3} mol/l) relativ unempfindlich. ATP hemmte den Uridin-Einbau im Bereich von 10^{-5} bis 10^{-3} mol/l konzentrationsabhängig bis zu 37,6 % ($p < 0,01$) (Abb. 11).

3.1.7. Nucleasenhemmung

Durch 100 µg/ml Dextransulfat als Nucleasenhemmstoff wurde der Thymidin-Einbau um 72,9 % ($p < 0,01$), der Uridin-Einbau um 33,4 % ($p < 0,01$) gesteigert (Abb. 12). Dextransulfat war auch erforderlich, um die Nucleinsäuresynthese über mehrere Stunden linear verlaufen zu lassen (s. 3.1.8.).

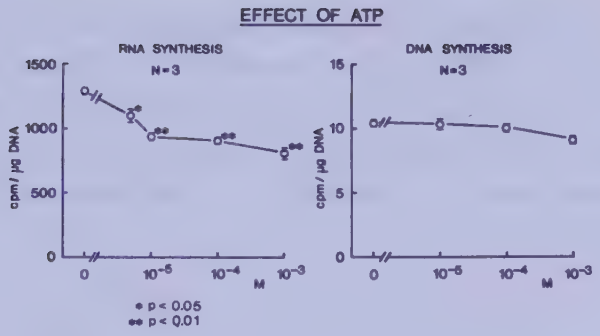


Abb. 11: Einfluß von ATP auf die Nucleinsäuresynthese der Fundusschleimhaut des Rattenmagens. Werte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

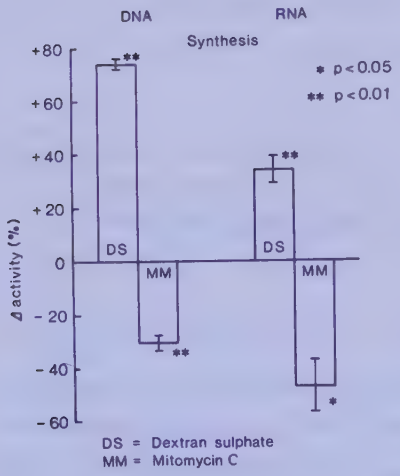


Abb. 12:
Stimulation der Nucleinsäuresynthese durch Dextransulfat und Hemmung durch Mitomycin C. N=5, Werte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

3.1.8. Nucleinsäuresynthese in Abhängigkeit der Zeit

Unter den ermittelten Optimalbedingungen verlief der Einbau von ^{3}H-Thymidin und ^{3}H-Uridin bis zu 4 h linear, ohne einer Sättigung im Sinne einer Ermüdung zuzustreben (Abb. 13). Allerdings verlief in diesem Zeitraum die DNA-Synthese wesentlich langsamer als die RNA-Synthese (s. auch 3.1.10.).

3.1.9. Lagerung der Zellkerne

Keine der untersuchten Konservierungsmethoden war zufriedenstellend. Die Aktivität der Nucleinsäuresynthese nahm schon nach wenigen Tagen rasch ab. Zudem schienen die qualitativen Eigenschaften verändert zu sein.

3.1.10. Vergleich der DNA- und RNA-Polymerase-Aktivitäten

Aus Versuchen, in denen in gleichen Präparationen parallel DNA- und RNA-Synthese gemessen wurden, ergab sich, daß die RNA-Polymerase-Aktivität etwa zehnmal höher ist ($10{,}2 \pm 0{,}76$, $p < 0{,}001$) als die DNA-Polymerase-Aktivität.

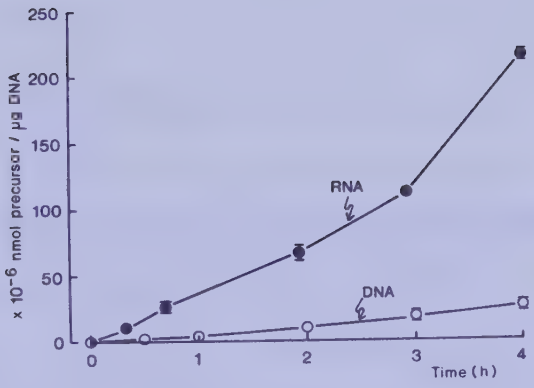


Abb. 13: Nucleinsäuresynthese der Fundusschleimhaut des Rattenmagens in Abhängigkeit von der Zeit, durchgeführt mit gereinigten Zellkernen. N=3, Werte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

3.1.11. Hemmbarkeit der Syntheseaktivität

In einer Konzentration von 10^{-4} mol/l hemmte das Antibioticum Mitomycin C den Thymidin-Einbau um 30,5 % ($p < 0,01$), in einer Konzentration von 2×10^{-4} mol/l den Uridin-Einbau um 48,1 % ($p < 0,05$) (Abb. 12).

3.1.12. Cyclische Nucleotide und 5'-AMP

Die Untersuchungen wurden in Gegenwart von Theophyllin in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l durchgeführt, um eventuell vorhandene Phosphodiesteraseaktivitäten zu hemmen. Theophyllin allein hatte keinen nennenswerten Einfluß auf die Nucleinsäuresynthese.

10^{-10} bis 10^{-5} mol/l cAMP beeinflußte die Aktivität der DNA-Polymerasen nicht. cAMP bewirkte eine deutliche Hemmung des Uridin-Einbaus mit einem Maximum von 35 % ($p < 0,01$) im Bereich von 10^{-9} bis 10^{-8} mol/l. Bei höheren cAMP-Konzentrationen ließ die Hemmwirkung nach (Abb. 14).

Im calciumfreien Milieu übte cAMP im Bereich von 10^{-7} bis 10^{-5} mol/l auf die DNA-Synthese EDTA-behandelter Zellkerne einen leichten Hemmeffekt aus (Abb. 15). Die maximale Hemmung betrug 17,1 % bei einer cAMP-Konzentration von 10^{-6} mol/l ($p < 0,05$).

cGMP übte im Bereich von 10^{-7} bis 10^{-6} mol/l auf die DNA-Polymerasen einen leicht stimulierenden Effekt aus. Die RNA-Polymerasen wurden durch cGMP gehemmt, wobei die

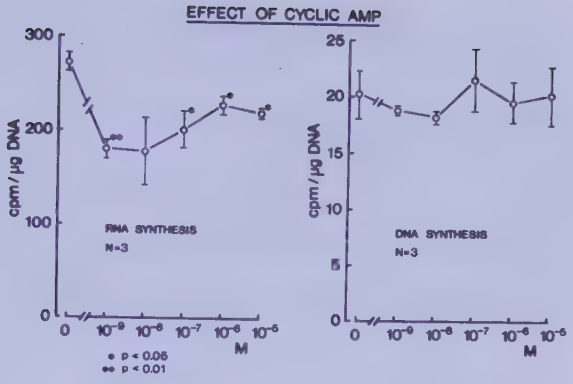


Abb. 14: Einfluß von cAMP auf die Nucleinsäuresynthese der Fundusschleimhaut des Rattenmagens. Werte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

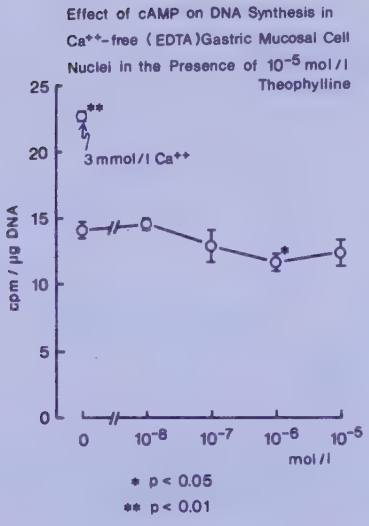


Abb. 15:
Einfluß von cAMP auf die Nucleinsäuresynthese der Fundusschleimhaut des Rattenmagens, durchgeführt mit EDTA-behandelten Zellkernen. N=4, Werte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

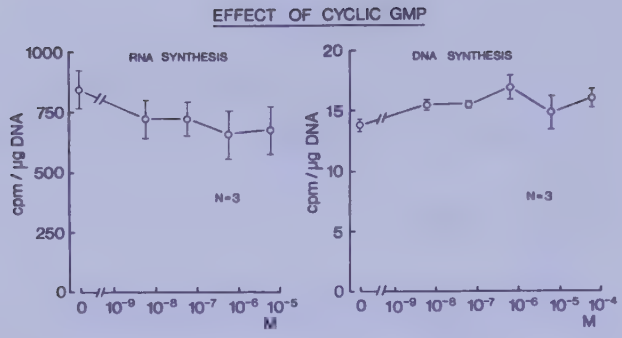


Abb. 16: Einfluß von cGMP auf die Nucleinsäuresynthese der Fundusschleimhaut des Rattenmagens. Werte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

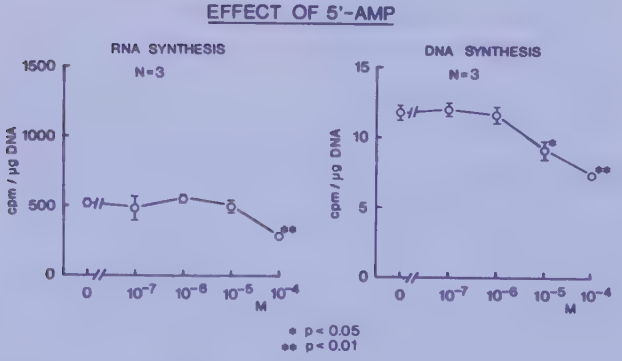


Abb. 17: Einfluß von 5'-AMP auf die Nucleinsäuresynthese der Fundusschleimhaut des Rattenmagens. Werte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

Hemmung im Bereich von 10^{-6} bis 10^{-5} mol/l am stärksten ausgeprägt war (Abb. 16).

5'-AMP vermochte sowohl die DNA- als auch die RNA-Synthese deutlich zu hemmen (Abb. 17). Bei einer Konzentration von 10^{-4} mol/l nahmen der Thymidin-Einbau um 37,6 % ($p < 0,01$) und der Uridin-Einbau um 45,2 % ($p < 0,01$) ab. Während die Hemmung der RNA-Synthese eng auf diesen Konzentrationsbereich beschränkt war, setzte die Hemmwirkung auf die DNA-Synthese schon bei 10^{-5} mol/l ein.

3.2. Untersuchung von Hormonen und Pharmaka in vitro

3.2.1. Histamin und H_2-Rezeptorantagonisten

Histamin beeinflußte im Bereich von 10^{-9} bis 10^{-5} mol/l die DNA-Synthese nicht; höhere Konzentrationen bewirkten eine leichte Hemmung, die bei 10^{-3} mol/l 11,8 % betrug ($p < 0,05$). Im gleichen Konzentrationsbereich wurde die RNA-Synthese um 17,9 % stimuliert ($p < 0,01$) (Abb. 18).

Metiamid beeinträchtigte die Nucleinsäuresynthese nur geringfügig. Die DNA-Synthese wurde im Bereich von 10^{-7} bis 10^{-5} mol/l um ca. 8 %, die RNA-Synthese durch 10^{-8} mol/l um 12,0 % ($p < 0,01$) gehemmt. Ein Zusatz von Histamin (10^{-6} und 10^{-3} mol/l) änderte den Effekt von Metiamid auf die DNA-Synthese nicht, es hob jedoch in einer Konzentration von 10^{-3} mol/l den Metiamid-Effekt auf die RNA-Synthese auf.

Cimetidin beeinflußte im Gegensatz zu Metiamid die RNA-Synthese nicht, wohl aber hemmte es den Thymidin-Einbau in einer Konzentration von 10^{-4} mol/l um 13,4 % ($p < 0,05$). Dieser Hemmeffekt änderte sich durch Zusatz von Histamin nicht.

Beim Meerschweinchenmagen senkte Metiamid den Uridin-Einbau nicht, allerdings wurde die RNA-Synthese durch Cimetidin in Konzentrationen von 10^{-8} bis 10^{-4} mol/l deutlich bis zu 33,5 % ($p < 0,02$) gesenkt (Abb. 19).

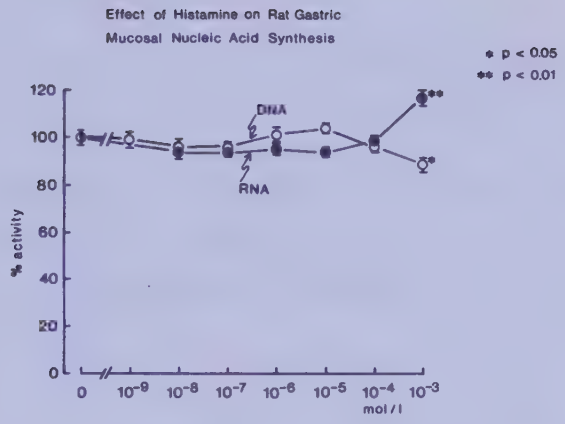


Abb. 18: Einfluß von Histamin in vitro auf die Nucleinsäuresynthese der Fundusschleimhaut des Rattenmagens. N=4, Werte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

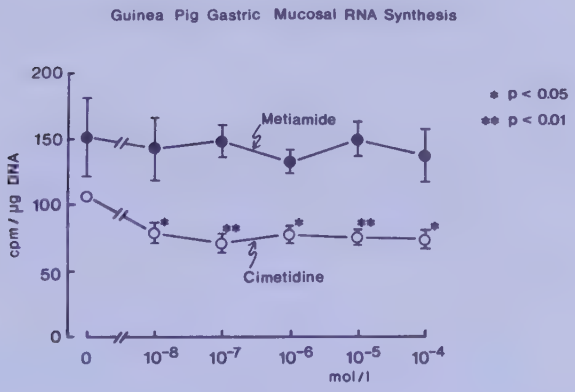


Abb. 19: Einfluß von H_2-Rezeptorenblockern in vitro auf die Nucleinsäuresynthese der Fundusschleimhaut des Meerschweinchenmagens. N=6, Werte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

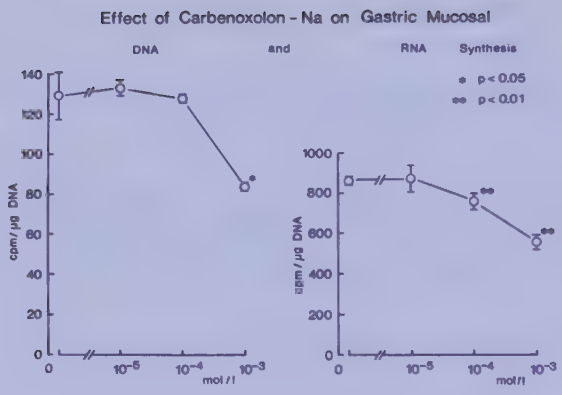


Abb. 20: Einfluß von Carbenoxolon-Na in vitro auf die Nucleinsäuresynthese der Fundusschleimhaut des Rattenmagens. N=3, Werte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

3.2.2. Carbenoxolon

Carbenoxolon beeinflußte in einer Konzentration von 10^{-5} und 10^{-4} mol/l die DNA-Synthese nicht, bei 10^{-3} mol/l war der Thymidin-Einbau um 35,7 % vermindert ($p < 0,05$). Bei der RNA-Synthese trat schon mit 10^{-4} mol/l Carbenoxolon eine leichte Hemmwirkung von 8,3 % auf ($p < 0,01$), bei 10^{-3} mol/l nahm der Uridin-Einbau um 32,2 % ab ($p < 0,01$) (Abb. 20).

3.3. Ernährung und Nahrungsfaktoren

3.3.1. Nahrungsentzug

Bereits ein Nahrungsentzug von 8 h bewirkte einen Abfall der DNA-Syntheseaktivität in der Magenfundusschleimhaut um 63,0 % ($p < 0,01$) im Vergleich zu den normal gefütterten Tieren. Die RNA-Synthese nahm um 81,0 % ab ($p < 0,01$). 16stündiges Hungern senkte den Thymidin-Einbau um 77,5 % ($p < 0,01$) und den Uridin-Einbau um 95,5 % ($p < 0,01$). Eine längere Hungerperiode von 24 h vermochte die Nucleinsäuresynthese nicht weiter zu senken (Abb. 21).

Die Nucleinsäuresynthese im Jejunum war weit weniger von der Nahrungszufuhr abhängig. Der 16stündige Nahrungsentzug hatte einen Abfall der DNA-Synthese von 39,5 % ($p < 0,05$) und der RNA-Synthese von 59,0 % ($p < 0,05$) zur Folge. Die Nucleinsäuresynthese der Niere wurde durch Hungern nicht beeinträchtigt (Abb. 21).

3.3.2. Wiederfütterung gehungerter Tiere

Mit erneuter Fütterung stiegen DNA- und RNA-Synthese wieder annähernd linear an (Abb. 22). Die DNA-Synthese erreichte nach 12 h, die RNA-Synthese nach 22 h ihren Ausgangswert.

Trotz der viel höheren Aktivität der RNA-Polymerasen

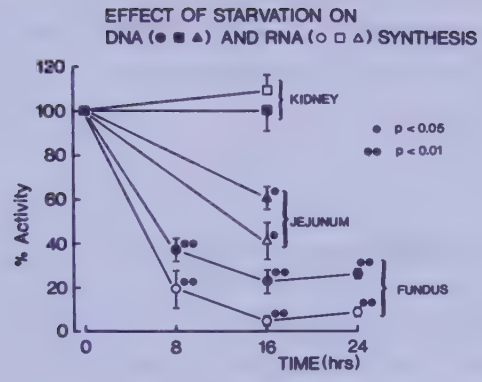


Abb. 21: Einfluß von Nahrungsentzug auf die Nucleinsäuresynthese der Fundusschleimhaut, Jejunalschleimhaut und Niere (gefütterte Tiere = 100 %). N=4, Werte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

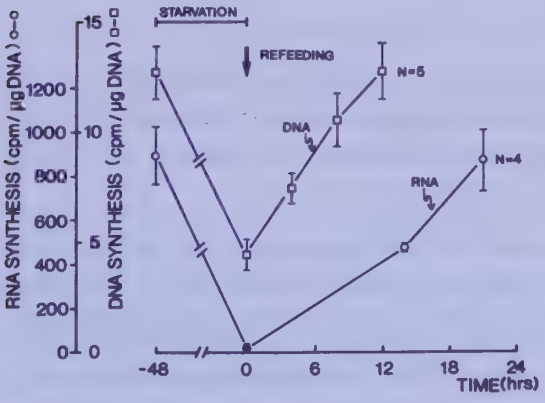


Abb. 22: Hemmung der Nucleinsäuresynthese der Fundusschleimhaut des Rattenmagens durch Hungern und Stimulation durch Wiederfütterung. Werte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

nahm die Regeneration der RNA-Synthese mehr Zeit in Anspruch, da die Beeinträchtigung der RNA-Synthese durch Hungern größer war als die der DNA-Synthese.

3.3.3. Nahrungsfaktoren

Bei folgenden Futtermischungen unterschied sich die DNA-Synthese signifikant von den Kontrollbedingungen (Tiere, die mit Altromin gefüttert waren):

1. Wenn mindestens einer der drei Hauptnahrungsbestandteile fehlte (Synthese erniedrigt)
2. Wenn bei Vorhandensein der drei Komponenten der Proteinanteil erhöht war (Synthese erhöht).

Beim Fehlen von Protein entsprach die DNA-Synthese der bei völligem Nahrungsentzug, obwohl die Menge der Nahrungsaufnahme normal war. Protein allein bewirkte eine geringe signifikante Stimulation. Ein Zusammenhang zwischen DNA-Synthese und Energiegehalt der Nahrung war nicht festzustellen (Abb. 23).

Ähnliche Verhältnisse wie bei der DNA-Synthese lagen auch bei der RNA-Synthese vor (Abb. 24). Abgesehen von der stärkeren Beeinträchtigung der RNA-Synthese durch Nahrungsentzug, war nur die Futtermischung in der Lage, diesen Abfall voll zu kompensieren, die neben anderen Komponenten einen hohen Protein- und Kohlehydratanteil hatte. Ansonsten treffen alle für die DNA-Synthese gemachten Aussagen

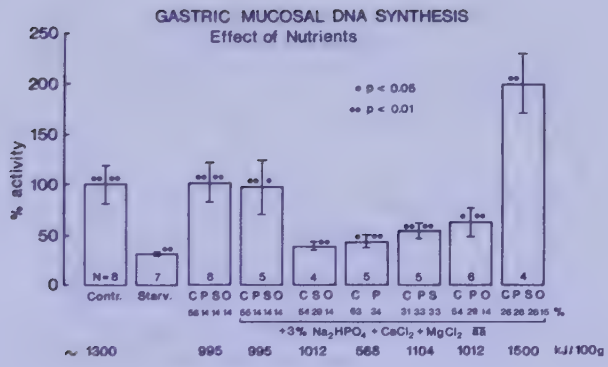


Abb. 23: Einfluß verschiedener Nahrungskompositionen auf die DNA-Synthese der Fundusschleimhaut des Rattenmagens (Contr. = mit Altromin R gefütterte Tiere, Starv. = 16 h nüchterne Tiere; C = Cellulose, P = Protein, S = Kohlehydrate, O = Olivenöl; Symbole links der Standardabweichung = Grad der Signifikanz im Vergleich zu den gehungerten Tieren, Symbole rechts davon = Grad der Signifikanz im Vergleich zu der Gruppe mit max. Stimulation). Werte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

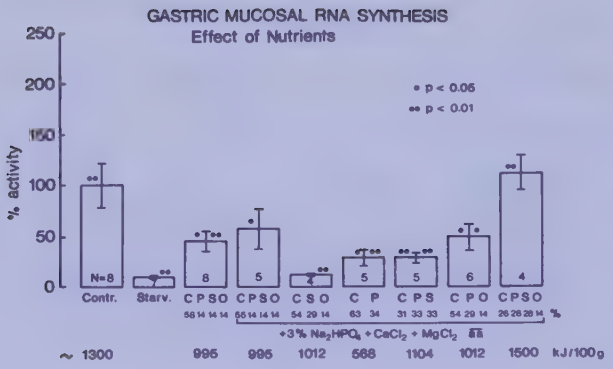


Abb. 24: Einfluß verschiedener Nahrungskompositionen auf die RNA-Synthese der Fundusschleimhaut des Rattenmagens (Abk. wie Abb. 23). Werte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

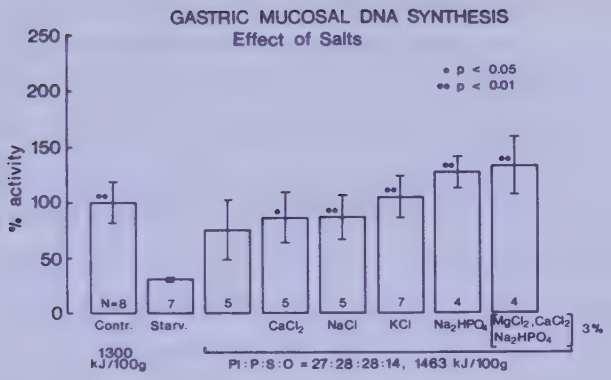


Abb. 25: Einfluß verschiedener Elektrolyte auf die DNA-Synthese der Fundusschleimhaut des Rattenmagens (Contr.=mit Altromin R gefütterte Tiere, Starv.= 16 h nüchterne Tiere; Pl=Psyllium, P=Protein, S= Kohlenhydrate, O=Olivenöl, * =Signifikanz im Vergl. zu den gehungerten Tieren). Werte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

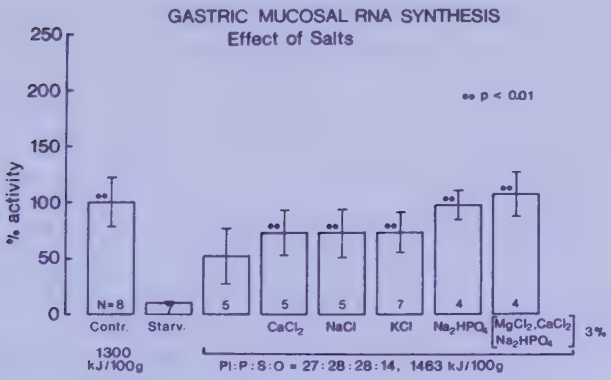


Abb. 26: Einfluß verschiedener Elektrolyte auf die RNA-Synthese der Fundusschleimhaut des Rattenmagens (Abk. wie Abb. 25). Werte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

auch für die RNA-Synthese zu.

Gegenüber der elektrolytfreien Nahrungskomposition wurde die DNA-Synthese durch Calcium und Natrium um 14,7 %, durch Kalium um 39,3 % und durch Na_2HPO_4 um 68,0 % gesteigert. Die beste Stimulation (76,0 %) erfolgte durch Zusatz einer Mineralsalzmischung aus gleichen Teilen Na_2HPO_4, $MgCl_2$ und $CaCl_2$ (Abb. 25).

Wiederum lagen auch hier die Verhältnisse für die RNA-Synthese ähnlich wie für die DNA-Synthese (Abb. 26). Calcium, Natrium und Kalium wirkten sich auf die RNA-Synthese gleichermaßen stimulierend aus; die Steigerung betrug 40,4 %. Na_2HPO_4 stimulierte den Uridin-Einbau um 85,6 %, die Mineralsalzmischung stimulierte um 106,7 %.

3.4. Einfluß von Pharmaka in vivo

3.4.1. Pentagastrin

3.4.1.1. Untersuchungen an nüchternen Ratten

Die DNA-Synthese der pentagastrinbehandelten Tiere war gegenüber den Kontrolltieren um 50,0 % ($p < 0,05$), die RNA-Synthese um 430,0 % ($p < 0,05$) erhöht (Abb. 27 und 28).

3.4.1.2. Untersuchungen an gefütterten Meerschweinchen

Während des Behandlungszeitraums war die Zunahme des Körpergewichts der Kontrolltiere und der pentagastrinbehandelten Tiere annähernd gleich. Auch das Gewicht der Antrum- und Fundusmucosa wurde durch Pentagastrin nicht signifikant verändert (Abb. 29).

Ebenfalls statistisch nicht signifikant war der Einfluß von Pentagastrin auf den Proteingehalt der Magenschleimhaut (Abb. 30). Pentagastrin erhöhte den DNA- und RNA-Gehalt signifikant. Die Zunahme an DNA betrug im Fundus 13,2 % ($p < 0,025$), im Antrum 11,5 % ($p < 0,05$), die des RNA-Gehalts im Fundus 35,2 % ($p < 0,025$) und des Antrums 27,8 % ($p < 0,05$) (Abb. 31).

Durch Pentagastrin nahm die Thymidin-Inkorporation im Fundus um 104,9 % ($p < 0,05$) und im Antrum um 122,1 %

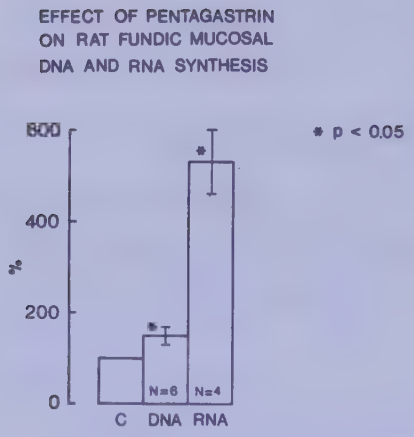


Abb. 27:
Stimulation der Nucleinsäuresynthese des Magenfundus nüchterner Ratten durch Pentagastrin (3 x tägl. 200 µg/kg KG i.p.) (C=48 h nüchterne Kontrolltiere). Werte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

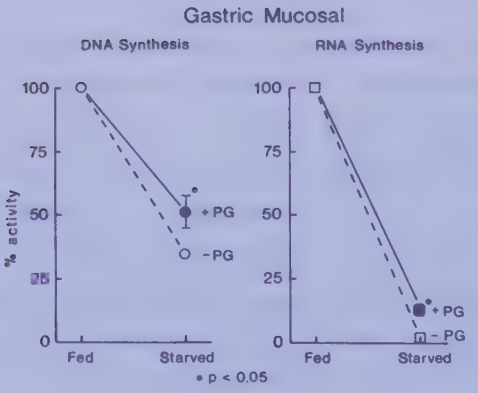


Abb. 28: Ergebnisse von Abb. 27 im Vergleich zu normal gefütterten Tieren (= 100 % Aktivität). N= 4 und 6, Werte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

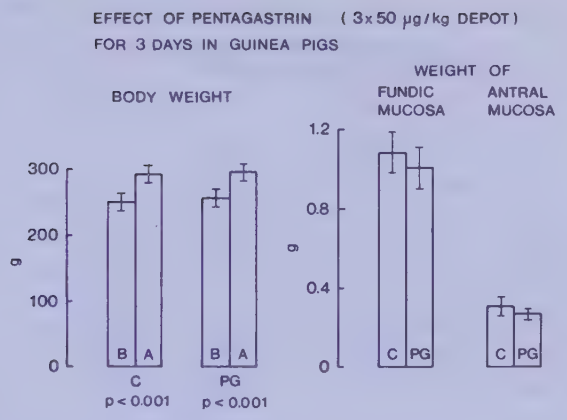


Abb. 29: Einfluß von Pentagastrin (PG) als Depot auf Körper-, Fundus- und Antrumgewicht normal gefütterter Meerschweinchen (C=Kontrolltiere; B=Gewicht vor, A=Gewicht nach der Behandlung). N=6, Werte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

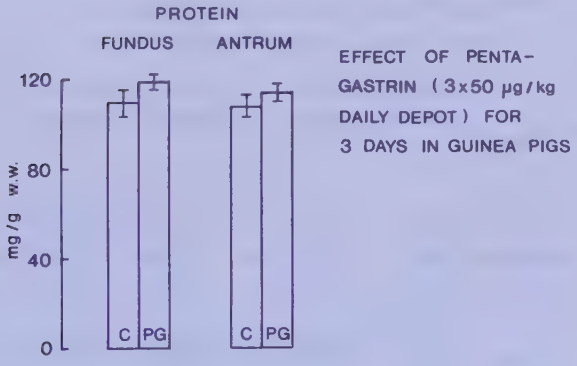


Abb. 30: Proteinkonzentration in der Magenfundus- und Magenantrumschleimhaut gefütterter Meerschweinchen durch Pentagastrin (PG) als Depot (C=Kontrolltiere). N=6, Werte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

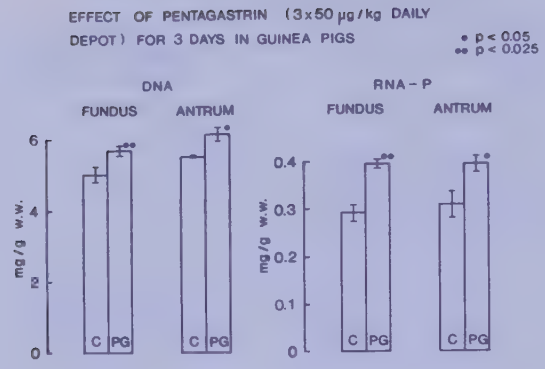


Abb. 31: Zunahme der DNA- und RNA-P-Konzentration in der Magenfundus- und Magenantrumschleimhaut gefütterter Meerschweinchen durch Pentagastrin (PG) als Depot (C=Kontrolltiere). N=6, Werte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

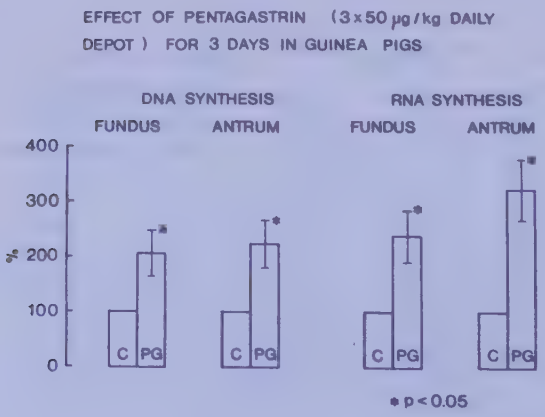


Abb. 32: Stimulation der DNA- und RNA-Synthese der Magenfundus- und Magenantrumschleimhaut gefütterter Meerschweinchen durch Pentagastrin (PG) als Depot (C=Kontrolltiere). N=6, Werte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

($p < 0,05$) zu; der Uridin-Einbau wurde im Fundus um 136,1 % ($p < 0,05$), im Antrum um 220,3 % ($p < 0,05$) gesteigert (Abb. 32).

3.4.2. Antrektomie

Unter normalen Fütterungsbedingungen lag die DNA-Synthese antrektomierter Ratten 256 % ($p < 0,01$) über der Aktivität der scheinoperierten Kontrolltiere, die RNA-Synthese war um 232 % ($p < 0,05$) erhöht. Durch 16stündigen Nahrungsentzug sank die Nucleinsäuresynthese der antrektomierten Tiere und der Kontrolltiere, und zwar so, daß die absoluten Aktivitäten bei beiden Populationen nun annähernd gleich waren. Die Hemmung der DNA-Synthese durch Hungern betrug bei den Kontrollen 89,6 % ($p < 0.02$), die der RNA-Synthese 77,7 % ($p < 0,05$). Bei den antrektomierten Tieren nahm der Thymidin-Einbau um 97,4 % ($p < 0,02$), der Uridin-Einbau um 94,5 % ($p < 0,05$) ab (Abb. 33).

Durch Pentagastrin wurde die DNA-Synthese der gefütterten antrektomierten Ratten um 473,4 % ($p < 0,01$) und die RNA-Synthese um 340,8 % ($p < 0,05$) gegenüber den unbehandelten Kontrolltieren gesteigert (Abb. 33).

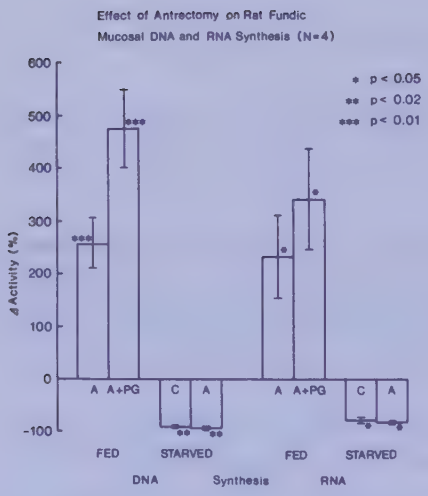


Abb. 33: Änderung der Nucleinsäuresynthese der Magenfundusschleimhaut normal gefütterter und 16 h nüchterner Ratten durch Antrektomie (A), sowie normal gefütterter antrektomierter Ratten nach dreitägiger Behandlung mit 250 µg/kg Pentagastrin (A + PG) im Vergleich zu normal gefütterten scheinoperierten Tieren. (C = 16 h nüchterne scheinoperierte Tiere). N = 4, Werte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

3.4.3. Ulcerogene Pharmaka

3.4.3.1. Indometacin

Bei Verabreichung hoher Indometacin-Dosen von zwei mal täglich 5 mg/kg Körpergewicht lag die Letalität über 30 %, alle Tiere hatten einen Ascites und Magenulcera, zudem war die Magenfüllung minimal und von dünnflüssiger Konsistenz, die Farbe der Magenschleimhaut war blaßrosa bis grau. Bei der Untersuchung der DNA- und RNA-Synthese zeigten sich von Versuch zu Versuch erhebliche Unterschiede in der Aktivität, die teils stark gehemmt, teils stark stimuliert war:

Indometacin-Behandlung

2 x tägl. 5 mg/kg KG, 3 Tage

Versuch	Aktivität der DNA-Synthese	Aktivität der RNA-Synthese
	(Kontrolle = 100 %)	
1	488 %	863 %
2	615 %	1 059 %
3	884 %	1 287 %
4	36,5 %	30,4 %
5	87,4 %	48,7 %
6	30,2 %	74,5 %

Bei Reduktion der Indometacin-Dosis auf die Hälfte (2,5 mg/kg KG) traten die geschilderten toxischen Erschei-

nungen nicht mehr auf. Die DNA-Synthese war nicht signifikant um 15,5 %, die RNA-Synthese um 35,5 % signifikant ($p < 0{,}002$) gehemmt. Die Nucleinsäuresynthese der Niere wurde nicht beeinflußt (Abb. 34).

3.4.3.2. Acetylsalicylsäure

Bis zu zwei mal täglich 120 mg/kg Acetylsalicylsäure führten in keinem Fall zu makroskopisch sichtbaren Schleimhautläsionen. Einflüsse auf die Nucleinsäuresynthese konnten nicht festgestellt werden.

3.4.3.3. Phenylbutazon

Bis zu zwei mal täglich 40 mg/kg Phenylbutazon verursachten keine makroskopisch sichtbaren Ulcera. Die Beeinflussung der Nucleinsäuresynthese war uneinheitlich, jedoch überwog die Tendenz zur Stimulation der DNA- und RNA-Synthese (Abb. 35).

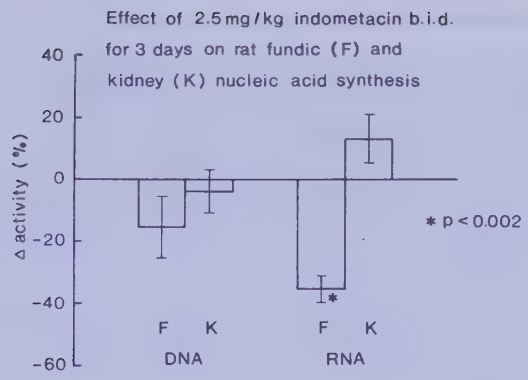


Abb. 34: Einfluß von Indometacin auf die Nucleinsäuresynthese der Magenfundusschleimhaut und der Niere gefütterter Ratten (F=Fundus, K=Niere). N=6, Werte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

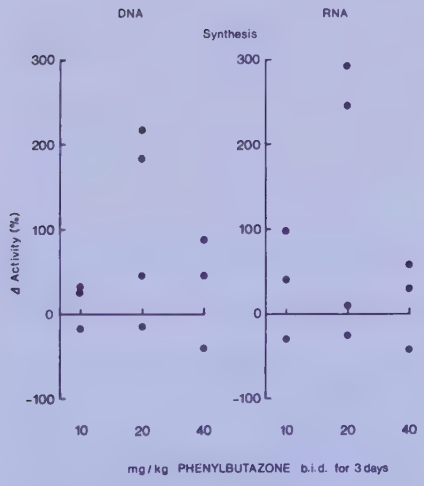


Abb. 35:
Einfluß von Phenylbutazon auf die Nucleinsäuresynthese der Fundusschleimhaut gefütterter Ratten. N = 1, Werte x

4. DISKUSSION

Für die Entwicklung geeigneter Untersuchungsmethoden der Nucleinsäuresynthese war als erster Schritt die Isolation gereinigter Zellkerne aus dem Gewebe der Magenschleimhaut notwendig. In der Literatur sind Verfahren zur Kernpräparation der Leber (62), der Niere und des Pankreas beschrieben, deren Gewebe sich quantitativ und in der Konsistenz von der Magenschleimhaut unterscheiden. Daher war es erforderlich, diese Methoden für die Magenschleimhaut zu adaptieren. Die beschriebene Isolationsweise erlaubt es, gereinigte, morphologisch intakte Kerne aus der Magenschleimhaut zu gewinnen.

Weiterhin war es erforderlich, die biochemische Funktionsfähigkeit der Kerne zu erhalten. Die einwandfreie DNA- und RNA-Synthese ist hierfür ein bedeutsames Kriterium. Nach Bollum (8) sind mindestens vier verschiedene DNA-Polymerasen aus Säugetierzellen isolierbar:

1. Die DNA-Polymerase α, die aus cytoplasmatischen Fraktionen isoliert werden kann, und deren Aktivität sich mit der Proliferationsrate der Zellen ändert.
2. Die DNA-Polymerase β aus dem Zellkern und dem Cytoplasma, deren Aktivität sich während der Proliferation wenig zu ändern scheint.
3. Die mitochondriale DNA-Polymerase und
4. die DNA-Polymerase γ.

Die beiden letzten spielen nur eine untergeordnete Rolle, da ihre Aktivität weniger als 1 % der Gesamtaktivität ausmacht.

Die Tatsache, daß ein beträchtlicher Teil der DNA-Polymerasen im Cytoplasma zu finden ist, obwohl die DNA-Synthese fast ausschließlich im Zellkern stattfindet, ist so zu erklären, daß nach Zerstörung der Zellstruktur und der anschließenden Isolation hochgereinigter Zellkerne ein Verlust des Enzyms durch Penetration nach außen erfolgt. Tatsächlich konnte Siebert (57) nachweisen, daß das Enzym in der lebenden Zelle im Zellkern lokalisiert ist. Diesen Umständen wird durch die schonende Isolationsmethode von Zellkernen aus der Magenschleimhaut Rechnung getragen; die Änderungen der DNA-Syntheseaktivität durch Hungern und andere äußere Einflüsse sprechen dafür, daß auch die DNA-Polymerase α in den isolierten Zellkernen aus der Magenschleimhaut aktiv ist. Nach Chambon (12) ist auch der überwiegende Teil der RNA-Polymerasen im Zellkern lokalisiert, wobei man solche unterscheiden kann, die sich im Nucleolus befinden und solche, die karyoplasmatischen Ursprungs sind. Erstere scheinen für die Synthese der rRNA, letztere für die Bildung der anderen RNA-Sorten verantwortlich zu sein. Die einwandfreie Funktionsfähigkeit der DNA- und RNA-Synthese mit den isolierten Zellkernen bestätigt deren biochemische Funktionstüchtigkeit. Da praktisch die Gesamtheit der DNA- und RNA-Polymerasen im Zellkern lokalisiert ist, ist der Zellkern auch das geeignete Objekt zur Untersuchung der Nucleinsäuresynthese eines Gewebes.

Eine Lagerung der Kerne scheint nicht möglich zu sein; die Aktivität der DNA-Synthese nimmt rasch ab, zudem verändern sich deren qualitativen Eigenschaften. Daher muß

die Messung der DNA- und RNA-Synthese unmittelbar im Anschluß an die Kernpräparation vorgenommen werden.

Die ermittelten Optima für die Nucleinsäuresynthese in isolierten Zellkernen der Magenschleimhaut liegen für Temperatur und pH im physiologischen Bereich und sind somit ein Hinweis, daß physiologische Vorgänge gemessen werden. Die pH-Werte liegen auch im Bereich der für isolierte Polymerasen vorliegenden Daten (8, 51).

Die Überlegenheit des Natriumacetat/hydrogencarbonat-Systems gegenüber den anderen getesteten Puffern kann daran liegen, daß Natriumacetat und Natriumhydrogencarbonat in den Zellen des Organismus vorkommen und somit als untoxisch gelten können.

Alle Nucleinsäurepolymerasen bedürfen für ihre Funktion der Anwesenheit einer Matrize, aller vier Ribo- bzw. Desoxyribonucleotide, sowie für die DNA-Synthese einer gewissen Menge an "primer" (14,25). Diese Voraussetzungen sind in intakten isolierten Zellkernen ausreichend gegeben. Außerdem benötigen die Polymerasen ein divalentes Kation. Für die DNA-Synthese ist Magnesium als divalentes Kation notwendig und deshalb im Inkubationsmedium enthalten. Die RNA-Synthese ist teils magnesium-, teils manganabhängig. Die magnesiumabhängige RNA-Polymerase scheint den Hauptteil der ribosomalen RNA zu synthesisieren, die manganabhängige scheint einer DNA-ähnlichen RNA (mRNA) zuzuordnen zu sein. Die Tatsache, daß Magnesium ein wesentlich breiteres Wirkspektrum besitzt als Mangan, wurde auch von Seifart (56) für die isolierte und gereinigte RNA-Polymerase

aus Zellkernen der Rattenleber gefunden. Von Atkinson (2) werden Transphosphorylierungsreaktionen als Kontrollfunktion der Nucleinsäuresynthese diskutiert. Die Notwendigkeit von Magnesium für diese Reaktionen läßt einen Wirkmechanismus des Magnesiums auch auf dieser Ebene vermuten.

Saccharose beeinflußt die Nucleinsäuresynthese vermutlich durch osmotische Effekte.

Unterschiedliche Empfindlichkeiten von DNA- und RNA-Polymerasen gegenüber Elektrolyten zeigt deren Verhalten gegenüber Kalium. Der Wirkmechanismus ist unklar.

Calcium scheint für die intakte Nucleinsäuresynthese eine wichtige Rolle zu spielen. Auch für andere Gewebearten wurden ähnliche Befunde erhoben; so erwähnt Harbers (25), daß die DNA-Polymerase aus Rattenleber durch Calcium stimulierbar ist, Kaplan und Richman (37) beschreiben einen erhöhten Einbau von ^{3}H-Uridin in die RNA des Myocards unter Calciumeinfluß. Neuere Untersuchungen sprechen dem Calcium eine second-messenger-Funktion zu und zeigen, daß in verschiedenen Geweben, wie beispielsweise Leber und Speicheldrüse, Calcium eine wichtige Substanz für den Ablauf der Zellteilung ist (5). Hier wird unter anderem ein direkter Einfluß auf den Zellkern für möglich gehalten. Unsere Ergebnisse mit der DNA- und RNA-Synthese in isolierten Zellkernen sprechen auch dafür. Die Stimulation der Nucleinsäuresynthese der Magenschleimhaut durch Calcium läßt sich eindrucksvoll darstellen, wenn die Zellkerne vor der Inkubation durch EDTA von endogenem Calcium befreit werden. Auf diese Kerne übt Calcium eine besonders starke

stimulierende Wirkung aus. Die RNA-Synthese ist darin empfindlicher als die DNA-Synthese, die für eine Stimulation höhere Calciumkonzentrationen benötigt.

ATP-Zusatz zum Inkubationsmedium hemmt die Nucleinsäuresynthese. Es ist bekannt, daß ATP Magnesiumionen komplex zu binden und somit in Bezug auf ihre physiologischen Aufgaben zu inaktivieren vermag. Hiermit wäre die Hemmwirkung des ATP auf die DNA-Synthese und teilweise auf die RNA-Synthese erklärbar. Da die RNA-Synthese jedoch weit stärker gehemmt wird als die DNA-Synthese, muß noch ein weiterer Hemmechanismus vermutet werden. Zwar könnten die RNA-Polymerasen empfindlicher auf eine Abnahme der Magnesiumionenkonzentration reagieren, es ist aber noch ein weiterer Gesichtspunkt zu berücksichtigen. So konnte von Maley und Maley (44) sowie von Overgaard-Hansen und Klenow (50) gezeigt werden, daß der Zusatz von Desoxyadenosin bei manchen Zellen zu einer Hemmung der DNA-Bildung führt, die durch Desoxyguanosin wieder aufgehoben werden kann. Offenbar hemmt das phosphorylierte Desoxyadenosin die Bildung von Desoxyguanosintriphosphat, dessen Ausfall dann eine Blockierung der DNA-Verdopplung zur Folge hat. Ähnlich wäre eine Hemmwirkung des Adenosintriphosphats auf die Bildung des Guanosintriphosphats denkbar. Da aber a l l e vier Ribonucleotide in phosphoryliertem Zustand vorliegen müssen, damit die RNA-Synthese vonstatten geht, nimmt die Syntheserate bei gehemmter GTP-Synthese ab. Somit wäre die negative Rückkopplung ein physiologischer Mechanismus zur Steuerung der Nucleinsäuresynthese.

Nach Sierakowska und Shugar (58) kommen im Kern drei verschiedene DNasen vor, welche ein Wirkoptimum bei pH 7 bis 8 besitzen und von divalenten Kationen wie Calcium und Magnesium abhängig sind. Diese Voraussetzungen sind im verwendeten Inkubationsmedium für die DNA-Synthese gegeben. Ebenfalls im Zellkern sind RNasen aktiv. Durch die Aktivität der Nucleasen ist es möglich, daß eingebaute markierte Substanzen wieder aus dem Makromolekül entfernt werden und der vorgelegene Einbau nicht erkannt wird. Eine einwandfreie Untersuchung der Polymerasenaktivitäten ist aber möglich durch Verwendung von Dextransulfat, welches ein Hemmstoff für Nucleasen ist und somit DNA- und RNA-Synthese positiv beeinflußt.

Der lineare Anstieg der Nucleinsäuresynthese über vier Stunden beweist eine gute Stabilität des Systems und ermöglicht auch, die Syntheserate in vitro über einen längeren Zeitraum zu verfolgen. Der Kurvenverlauf wird sowohl bei der DNA- als auch bei der RNA-Synthese nach 3 h eher steiler. Dies kann ein Hinweis darauf sein, daß das System erst nach dieser Zeit wieder zur vollen Synthesekapazität zurückfindet, welche im Laufe der Präparation gelitten hat. Andererseits ist denkbar, daß eine Einlagerung von ^{3}H-Thymidin und ^{3}H-Uridin in Proteinbestandteile beginnt, was jedoch bei der normalerweise verwendeten Inkubationsdauer von 1 h keine Rolle spielt.

Der Beweis, daß es sich bei den gemessenen Aktivitäten um einen echten Einbau der markierten Substanzen in die DNA bzw. RNA handelt, wird durch Zusatz eines spezifischen

Hemmstoffes erbracht. Das Antibioticum Mitomycin C, das in den Kernstoffwechsel eingreift und mit dem DNA- und RNA-Metabolismus von Bakterien und höheren Organismen interferiert (38), hemmt den ^{3}H-Thymidin- und ^{3}H-Uridin-Einbau der Zellkerne aus der Magenschleimhaut deutlich, was darauf schließen läßt, daß die gemessenen Einbauraten die DNA- und RNA-Synthese repräsentieren.

Für die intrazelluläre Vermittlung von Hormonwirkungen am Gastrointestinaltrakt gilt cAMP als eine Schlüsselsubstanz (39). Pentagastrin vermag die Adenylatcyclase der Magenschleimhaut zu stimulieren, während die Enzymaktivität durch Hungern gehemmt und durch Wiederfütterung reaktiviert wird (53). Da die genannten Faktoren auch die Nucleinsäuresynthese der Magenschleimhaut im gleichen Sinne zu beeinflussen vermögen, lag es nahe, den Einfluß von cAMP auf die Nucleinsäuresynthese der Magenschleimhaut zu untersuchen. An unterschiedlichen Geweben konnte eine stimulierende Wirkung des cAMP auf die DNA- und RNA-Synthese nachgewiesen werden, es liegen aber auch Arbeiten vor, die Hemmwirkungen beschreiben. So fanden Jost und Sahib (35) bei in vitro Inkubation isolierter Zellkerne der Rattenleber mit Dibutyryl-cAMP eine erhöhte RNA-Synthese. In vitro verabreichtes Dibutyryl-cAMP stimuliert die Uridin-Inkorporation in die RNA von Schweineschilddrüsengewebe, während bei direkter Zugabe zu den Kernen die RNA-Polymerasenaktivität nicht beeinflußt wird (1); auch bei Inkubation von Schilddrüsenzellen mit Dibutyryl-cAMP wurde eine Erhöhung des Uridin-Einbaus beobachtet (65). Stimulierende Effekte

von cAMP-Analogen auf die DNA-Synthese von Epithelzellen in vitro wurden von Filosa et al. (21) beschrieben, während Ryan und Heidrick (54) sowie Frank (23) in Untersuchungen mit Zellkulturen bei Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels eine Hemmung der DNA-Synthese fanden. Daß DNA- und RNA-Synthese in einem Gewebe nicht gleichsinnig beeinflußt werden müssen, zeigt die Arbeit von Averner et al. (3) mit Pferdelymphocyten, wo cAMP zwar den Uridin-Einbau, nicht aber den Thymidin-Einbau stimuliert. Auch dem cGMP werden Wirkungen auf die Nucleinsäuresynthese zugeschrieben. Diamantstein und Ulmer (18) fanden, daß in Zellkulturen von Mäuselymphocyten cGMP die Thymidin-Inkorporation steigert und cAMP diese hemmt. Dieser Befund konnte von Filosa et al. nicht bestätigt werden.

Versucht man, nach Berridge (5) auch in der Magenschleimhaut Calcium und cAMP funktionell zu verbinden, dann wäre bei einem "monodirectional system" eine Steigerung des Calciumeffekts und bei einem "bidirectional system" eine Hemmung des Calciumeffekts zu erwarten. Auf die DNA-Synthese der Magenschleimhaut ist kein nennenswerter Effekt des cAMP nachweisbar, jedoch wird die RNA-Synthese deutlich gesenkt. Ob nun für die RNA-Synthese der Magenschleimhaut ein "bidirectional system" vorliegt, ist damit noch nicht sicher bewiesen, da auch ein direkter Einfluß des cAMP in Betracht kommt. Da infolge hoher Calciumkonzentrationen in den Zellkernen und im Inkubationsmedium mögliche Effekte des cAMP auf die DNA-Synthese maskiert werden können, wurde mit calciumarmen Kernen nach EDTA-Be-

handlung in calciumfreiem Medium die Wirkung des cAMP untersucht. Die Einflüsse des cAMP auf den Thymidin-Einbau sind auch in diesem System gering; die Hemmwirkung ist wesentlich geringer als bei der RNA-Synthese. Es ist somit anzunehmen, daß die Stimulation der Nucleinsäuresynthese der Magenschleimhaut nicht über cAMP abläuft. Diese Annahme wird auch dadurch gestützt, daß Histamin, welches die Adenylatcyclase stimuliert, in vivo nicht im Stande ist, die Syntheserate der DNA zu erhöhen (32).

Die Calciumeffekte in der Magenschleimhaut scheinen nicht über eine Erhöhung des cGMP-Spiegels, wie in anderen Geweben teilweise beobachtet (5), zu erfolgen. Hier zeigt sich eher eine Hemmwirkung auf die Nucleinsäuresynthese.

Ob bei der Hemmwirkung des 5'-AMP auch die Bildung von ATP und die dabei möglichen Mechanismen eine Rolle spielen, kann nicht ausgeschlossen werden.

1968 nahmen Kahlson und Rosengren (36) an, Histamin könne die Wachstumsrate verschiedener Gewebe beeinflussen. Kürzlich zeigte Byron (11) in vitro, daß 4-Methylhistamin die Syntheserate für DNA im Knochenmark steigert und der H_2-Rezeptorantagonist Metiamid diesen Effekt antagonisiert. Derartiges trifft für die DNA-Synthese der Magenschleimhaut nicht, für die RNA-Synthese in geringem Umfang zu. Cimetidin hemmt die DNA-Synthese im Rattenmagen. Diese Hemmung kann durch Histamin nicht antagonisiert werden. Im Meerschweinchenmagen bewirkt Cimetidin eine deutliche Hemmung des Uridin-Einbaus. Derartig unsystematische Effek-

te lassen darauf schließen, daß hier species-spezifische Unterschiede vorliegen, die mit H_2-Rezeptoren nichts zu tun haben.

Carbenoxolon, welches bei der Therapie des peptischen Ulcus eingesetzt wird, soll eine Verlängerung der Lebensdauer von Epithelzellen der Magenschleimhaut bewirken (41). Untersuchungen, welche in vitro eine Stimulation der DNA-Synthese durch Carbenoxolon zeigen (Mitznegg, persönliche Mitteilung), müssen aufgrund der nun vorliegenden Untersuchungen in Frage gestellt werden. Ob die festgestellten Hemmeffekte auch in vivo eine Rolle spielen, ist noch nicht sicher. Es ist aber denkbar, daß hohe Carbenoxolon-Konzentrationen in den Zellen der Magenschleimhaut vorliegen, da bis zu 80 % der Substanz über den Magen resorbiert wird.

Ein Zusammenhang zwischen aufgenommener Nahrung und Erneuerung der gastrointestinalen Epithelzellen wird von verschiedenen Autoren berichtet. Brown et al. (9) konnten eine verminderte DNA-Synthese und Zellproliferation in den Epithelzellen des Intestinums gehungerter Mäuse nachweisen; Steiner et al. (59) stellten im Rattendünndarm nach längerer Hungerperiode einen beträchtlichen Abfall des DNA-, RNA- und Proteingehalts fest; Willems et al. (64) fanden eine erhöhte Zellproliferation in der Fundusmucosa von Hunden nach Nahrungsaufnahme. Eine Messung des Thymidin- und Uridin-Einbaus in die Nucleinsäuren der Fundusmucosa war bislang noch nicht durchgeführt worden. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß die Nucleinsäuresynthese

der Magenschleimhaut beim Hungern stark abnimmt und auf Wiederfütterung wieder ansteigt. Wenngleich auch die Nucleinsäuresynthese anderer Bereiche des Gastrointestinaltrakts eine Abhängigkeit von der Nahrungsaufnahme aufweisen, so scheint doch der Magen besonders empfindlich auf Nahrungsentzug zu reagieren, da DNA- und RNA-Synthese des Jejunums wesentlich geringer beeinträchtigt werden. Auch die von Webster und Tyor (61) gefundene Hemmung der RNA-Synthese im Pankreasgewebe gehungerter Tauben ist bei weitem geringer als in der Magenschleimhaut gehungerter Ratten. Die Nucleinsäuresynthese der Niere scheint von der Nahrungsaufnahme unabhängig zu sein.

Die Fütterungsversuche lassen die Frage offen, ob in der Magenschleimhaut die Nucleinsäuresynthese durch Nahrungsbestandteile direkt oder indirekt durch eine mit der Nahrungsaufnahme einhergehende Gastrinausschüttung stimuliert wird. Lichtenberger et al. (40) stellten bei gehungerten Ratten eine starke Abnahme des Gastringehalts im Antrum und Serum fest. Somit könnte ein ursächlicher Zusammenhang zwischen dem verminderten Gastringehalt der Magenschleimhaut und der Abnahme der Nucleinsäuresynthese im Magenfundus nach Nahrungsentzug vorliegen. Für eine positive Beeinflussung der DNA- und RNA-Synthese des Magens durch Gastrin sprechen auch die Verhältnisse beim Zollinger-Ellison-Syndrom (Schleimhauthypertrophie) und nach Antrektomie (Schleimhautatrophie). Tatsächlich konnte eine sogenannte trophische Wirkung, die durch erhöhte DNA-, RNA- und Protein-Synthese charakterisiert ist, für Gastrin

nachgewiesen werden. So wurde zunächst von Crean et al. (15) eine Zunahme der Dicke der Fundusmucosa und eine Vermehrung der Parietalzellen nach Verabreichung von Pentagastrin, dem synthetischen Derivat des Gastrins, beobachtet. Anschließend wurde von Johnson et al. (29,30) eine Stimulation der Proteinsynthese nach Gastrin- oder Pentagastrinbehandlung gehungerter Ratten für die Magenschleimhaut und das Duodenum nachgewiesen. Die stimulierende Wirkung des Pentagastrins auf die DNA-Synthese in Magen, Duodenum und Ileum wurde von Johnson und Guthrie (31), im Colon von Johnson (27) und auf die RNA-Synthese in Magen und Duodenum von Chandler und Johnson (13) wiederum an gehungerten Tieren gezeigt. Dabei konnte festgestellt werden, daß die Pentagastrinwirkung auf die Nucleinsäuresynthese 16 h nach der Injektion ihr Maximum erreicht, daß die Wirksamkeit von Pentagastrin und der verschiedenen Gastrinformen (I und II) in ihrer Fähigkeit zur Stimulation keinen signifikanten Unterschied aufweisen und daß eine Pentagastrin-Dosis von 200 bis 250 µg/kg Körpergewicht i.p. eine maximale Stimulation hervorruft (31,34); diese Kinetik wurde in der vorliegenden Arbeit bei Untersuchungen mit Pentagastrin zugrundegelegt. Die trophischen Eigenschaften des Hormons waren also hinlänglich bewiesen. Die offene Frage war noch, ob Gastrin d a s Stimulans der Nucleinsäuresynthese in der Magenschleimhaut und somit in der Lage ist, den durch Hungern bedingten Abfall der Syntheseaktivität zu verhindern. Der entsprechende Versuch zeigt wieder den stimulierenden Einfluß des Pentagastrins auf die

DNA- und RNA-Synthese, er beweist aber auch, daß die Syntheserate immer noch erheblich geringer ist als bei gefütterten Tieren. Demnach ist Pentagastrin nicht in der Lage, die durch Nahrungskarenz bedingte Abnahme der Nucleinsäuresynthese zu verhindern.

Dieses Ergebnis ließ vermuten, daß Nahrungsfaktoren unabhängig von Gastrin notwendig sind, um eine normale DNA- und RNA-Synthese in der Magenschleimhaut aufrecht zu erhalten. Diese ist nur dann gegeben, wenn alle drei essentiellen Bestandteile der Nahrung gleichzeitig vorhanden sind, so daß die qualitative Zusammensetzung der Nahrung, nicht deren Energiegehalt von entscheidender Bedeutung ist. Eine Dehnung des Magens allein ist für eine Stimulation der Nucleinsäuresynthese nicht ausreichend. Da Aminosäuren wie Phenylalanin und Tryptophan zu den aktivsten gastrinfreisetzenden Substanzen zählen (60), kann die geringe Aktivität nach Verabreichung reiner Proteinnahrung als ein weiterer Beweis für eine ungenügende Stimulation des Thymidin- und Uridin-Einbaus durch Gastrin gewertet werden. Der fördernde Einfluß von Elektrolyten in der Nahrung ist ungenügend und läßt keinerlei Interpretation zu.

Die Wirkung von Gastrin bzw. Pentagastrin auf die Nucleinsäuresynthese der Magenschleimhaut war bisher nur an Ratten untersucht worden; zudem waren die Tiere zum Zeitpunkt des Versuchs immer nüchtern. Die Versuche mit gefütterten Meerschweinchen zeigen, daß Pentagastrin in relativ niedriger Dosierung in der Lage ist, DNA- und RNA-Synthese sowie deren Gehalt im Gewebe sowohl in der Fun-

dus- als auch in der Antrummucosa auch anderer Species wie Ratten zu erhöhen. Die Zunahme der RNA-Synthese und des Proteingehalts lassen auch eine Stimulation der Proteinsynthese vermuten. Auffallend ist die starke Aktivitätssteigerung der Nucleinsäuresynthese trotz niedriger Pentagastrin-Dosierung. Bei Ratten wurden drei mal täglich 250 µg Pentagastrin/kg Körpergewicht verabreicht und Stimulationen im Fundus von 50-100 % der DNA- und von ca. 250 % der RNA-Synthese erreicht (33,13), beim Meerschweinchen bewirkt 1/5 der Dosis eine Steigerung des Thymidin-Einbaus um 105 % und des Uridin-Einbaus um 136 %. Wahrscheinlich ist der Meerschweinchenmagen sensibler gegenüber Pentagastrin als der Rattenmagen. Bedeutsam kann auch die Applikationsform insofern sein, als durch die Depotform eine längere Wirkungsdauer erreicht wird als durch i.p.-Injektionen. Außerdem ist durch die normale Fütterung ein physiologischer Zustand mit Intaktheit aller Enzymsysteme garantiert, während dies bei nüchternen Tieren nicht der Fall ist. Zu den bislang vorliegenden Erkenntnissen steht die Tatsache im Widerspruch, daß Pentagastrin auch die Nucleinsäuresynthese im Antrum stimuliert. Bisher hatte Pentagastrin im Antrum eher einen hemmenden Effekt auf die Nucleinsäure- und Proteinsynthese (28). Es ist wahrscheinlich, daß auch für diese unterschiedlichen Ergebnisse der Fütterungszustand der Tiere zum Zeitpunkt des Versuchs eine Rolle spielt.

Um die physiologische Bedeutung des Gastrins auf die Nucleinsäuresynthese der Fundusschleimhaut zu klären, wur-

de Ratten der gastrinproduzierende Teil des Magens durch Antrektomie entfernt. Die stark erhöhte DNA- und RNA-Synthese steht zunächst im Widerspruch zu der Tatsache, daß Gastrin ein trophisches Hormon für die Magenschleimhaut ist. Die makroskopisch sichtbare Atrophie der Schleimhaut weist aber deutlich auf degenerative Prozesse hin. Somit könnte die Stimulation der Nucleinsäuresynthese eine sekundäre Folgeerscheinung der Antrektomie sein, nämlich zum Zweck der Geweberegeneration. Die Übereinstimmung der Syntheseaktivität nüchterner antrektomierter Tiere mit derjenigen nüchterner Kontrolltiere beweist wieder die Notwendigkeit der Nahrungsaufnahme für die Stimulation von DNA- und RNA-Synthese. Durch Pentagastrin-Behandlung normal gefütterter antrektomierter Tiere wird die erhöhte Nucleinsäuresynthese nicht gesenkt, sondern noch zusätzlich gesteigert. Dies ist ein Hinweis dafür, daß die Stimulation der Nucleinsäuresynthese nicht eine unmittelbare Folgeerscheinung eines Gastrinmangels sein kann und daß das Hormon selbst trophische Eigenschaften besitzt.

Eine Nebenwirkung der antiinflammatorischen Pharmaca ist eine Irritation der Magenschleimhaut mit Haemorrhagie und Ulceration, wobei die Proliferation der Magenepithelzellen entweder gehemmt oder stimuliert sein kann, wie Untersuchungen am Menschen und an Tieren hindeuten.

Bereits bei niedriger Dosierung, bei der noch keine Schleimhautläsionen auftreten, hemmt Indometacin die DNA- und RNA-Synthese. In höheren Dosen, bei denen Schleimhautläsionen makroskopisch sichtbar werden, ist bei einem Teil

der Tiere die Nucleinsäuresynthese gehemmt, bei einem anderen Teil stark gesteigert. Das läßt sich dadurch erklären, daß in der Initialphase der Entstehung der Läsionen die Nucleinsäuresynthese gehemmt und in der Reparationsphase kompensatorisch stark gesteigert ist. Der fehlende Einfluß von Indometacin auf die Nucleinsäuresynthese der Niere spricht für den lokaltoxischen Effekt dieser Substanz.

Acetylsalicylsäure und Phenylbutazon führen nach dreitägiger Behandlung in keinem Fall zu makroskopisch sichtbaren Schädigungen der Magenschleimhaut. Eine eindeutige Hemmung der Nucleinsäuresynthese ist nicht nachweisbar. Auch von Max und Menguy (46) wurde gezeigt, daß Acetylsalicylsäure die Mitoserate und Thymidin-Incorporation nicht beeinflußt. Hingegen beschreibt Willems (63) eine Beeinträchtigung der Mitose der Magenschleimhaut. Bei Phenylbutazon ist eher die Tendenz zu einer Stimulation der Nucleinsäuresynthese gegeben, was wieder auf regenerative Prozesse hinweist. Nach Hollander (s. 46) besteht ein protektives System für die Magenschleimhaut, bestehend aus einer Schleimbarriere, welche kontinuierlich von den darunterliegenden Epithelzellen gebildet wird. Menguy und Masters (48) konnten zeigen, daß unter Einfluß von Acetylsalicylsäure die Schleimsekretion im Hundemagen eingeschränkt ist. Menguy und Desbaillets (47) fanden gleiches für Phenylbutazon. Aufgrund dieser Beobachtungen wird angenommen, daß Acetylsalicylsäure und Phenylbutazon die Magenschleimhaut durch Störung der protektiven Schleimbarriere angreifen. Max und Menguy (46) fanden in der Waschflüssigkeit

von Heidenhaintaschen im Hundeversuch eine erhöhte DNA-Menge nach Acetylsalicylsäure-Gabe, was auf eine erhöhte Abstoßung oberflächlicher Epithelzellen schließen läßt; ähnliche Befunde wurden auch von Croft (16) am menschlichen Magen erzielt. Die Ergebnisse von Bollet (7), der eine verminderte Mucopolysaccharidsynthese unter Acetylsalicylsäure und Phenylbutazon feststellte, sprechen dafür, daß diese Substanzen die Konsistenz der interzellulären Mucopolysaccharide verändern und somit den interzellulären Zusammenhalt vermindern. Yeomans et al. (66) unterscheiden zwei verschiedene Arten der Schleimhautschädigung durch Acetylsalicylsäure, eine oberflächliche Form, die nicht bis zu den ^{3}H-Thymidin-markierten Zellen in der proliferativen Zone reicht, und eine andere Form mit tiefgreifenden Schädigungen bis in die proliferative Zone und einer Zunahme an ^{3}H-Thymidin-markierten Zellen in der Nähe der Erosionen. Somit scheint sich die schädigende Wirkung der Acetylsalicylsäure und wohl auch des Phenylbutazons von der des Indometacins dadurch zu unterscheiden, daß diese Substanzen im Gegensatz zu Indometacin die Nucleinsäuresynthese primär nicht beeinflussen. Im fortgeschrittenen Stadium der Ulceration besteht wahrscheinlich in jedem Fall die Tendenz, durch verstärkte DNA- und RNA-Synthese die Verluste zu kompensieren. Daß dieses Phaenomen im vorliegenden Versuch bei Phenylbutazon nicht sehr deutlich und bei Acetylsalicylsäure praktisch nicht nachweisbar ist, liegt sicherlich an der relativ kurzen Behandlungsdauer.

5. Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die physiologische Regulation und pharmakologische Beeinflussung der Nucleinsäuresynthese der Magenschleimhaut zu untersuchen, was durch Messung der Incorporation von ^{3}H-Thymidin in die DNA und von ^{3}H-Uridin in die RNA isolierter Zellkerne oder eines Gesamthomogenats möglich war.

2. Der Versuch einer Optimierung der Inkubation ergab folgende optimale Bedingungen:

   DNA-Synthese:

   Temperatur: 37°C; pH: 7,45; Saccharose: ca. 200 mmol/l; Kalium: ca. 25 mmol/l; Calcium: ca. 5 mmol/l; Magnesium: 0,1 mmol/l; Thymidin: min. 2,0 x 10^{-7} mol/l.

   RNA-Synthese:

   Temperatur: 37°C; pH: 7,3; Saccharose: ca. 150 mmol/l; Calcium: 0,5 mmol/l; Magnesium: 0,1 mmol/l; Mangan: 0,01 mmol/l; Uridin: min. 6,1 x 10^{-7} mol/l.

3. CAMP hemmt die RNA-Synthese, beeinflußt die DNA-Synthese jedoch nicht. CGMP hat keinen nennenswerten Einfluß auf die Nucleinsäuresynthese. Sowohl 5'-AMP als auch ATP hemmen die Nucleinsäuresynthese konzentrationsabhängig.

4. Zusatz von Mitomycin C zum Inkubationsmedium hemmt die Nucleinsäuresynthese.

5. Die Wirkungen von Histamin und H_2-Rezeptorenblockern auf die Nucleinsäuresynthese sind unsystematisch und lassen sich nicht nach den üblichen Kriterien im Sinne eines Agonismus-Antagonismus interpretieren.

6. Carbenoxolon hemmt in vitro die Nucleinsäuresynthese dosisabhängig.

7. Die Nucleinsäuresynthese der Magenschleimhaut ist im Vergleich zu anderen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts in besonderem Maß nahrungsabhängig. Eine maximale Synthese ist nur bei gleichzeitiger Fütterung von Proteinen, Kohlenhydraten und Fett gegeben. Entfernung eines der Bestandteile reduziert die DNA- und RNA-Synthese signifikant.

8. Pentagastrin steigert die Nucleinsäuresynthese sowohl bei nüchternen als auch bei gefütterten Tieren signifikant, es ist jedoch nicht in der Lage, den durch Nahrungskarenz bedingten Abfall der Syntheserate zu kompensieren. Nach Antrektomie ist die Nucleinsäuresynthese der Magenschleimhaut deutlich gesteigert. Der Mechanismus dieser Steigerung ist noch ungeklärt. Durch zusätzliche Gabe von Pentagastrin wird die durch Antrektomie erhöhte Syntheserate weiter gesteigert.

9. Indometacin führt in niedrigen Dosen zu einer Hemmung, in höheren Dosen (mit eindeutig nachweisbaren Ulcerationen) zu einer Steigerung der Nucleinsäuresynthese im

Sinne einer Regeneration der Schleimhaut. Acetylsalicylsäure und Phenylbutazon haben keinen eindeutigen Einfluß auf die Nucleinsäuresynthese.

10. Die Ergebnisse haben gezeigt:

1. daß zur Messung der Nucleinsäuresynthese der Magenschleimhaut sehr präzise Inkubationsbedingungen erforderlich sind,
2. daß die Nucleinsäuresynthese auf Veränderungen in der Nahrungszufuhr sehr empfindlich reagiert,
3. daß eine toxische Schädigung der Magenschleimhaut mit einer Störung der Nucleinsäuresynthese einhergeht.

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

(1) Adiga, P.R.; Murthy, P.V.N.; McKenzie, J.M.:
Stimulation by thyrotropin, long-acting thyroid stimulator, and dibutyryl 3',5'-adenosine monophosphate of protein and ribonucleic acid synthesis and ribonucleic acid polymerase activities in porcine thyroid in vitro.
Biochemistry 10: 702-711, 1971.

(2) Atkinson, D.E.:
The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers.
Biochemistry 7: 4030-4045, 1968.

(3) Averner, M.J.; Brock, M.L.; Jost, J.-P.:
Stimulation of ribonucleic acid synthesis in horse lymphocytes by exogenous cyclic adenosine 3',5'-monophosphate.
J. Biol. Chem. 247: 413-417, 1972.

(4) Baserga, R.:
Biochemistry of the cell cycle: a review.
Cell Tissue Kinet. 1: 167-191, 1968.

(5) Berridge, M.J.:
The interaction of cyclic nucleotides and calcium in the control of cellular activity.
Advances in Cyclic Nucleotide Research 6: 1-98, 1975.

(6) Bizzozero, G.:
Über die Regeneration der Elemente der schlauchförmigen Drüsen und des Epithels des Magendarmkanals.
Anat. Anz. 3: 781-784, 1888.

(7) Bollet, A.J.:
Inhibition of glucosamine-6-PO_4 synthesis by salicylate and other anti-inflammatory agents in vitro.
Arthritis Rheum. 4: 624, 1961.

(8) Bollum, F.J.:
Mammalian DNA polymerases.
Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology 15: 109-144, 1975.

(9) Brown, H.O.; Levine, M.L.; Lipkin, M.:
Inhibition of intestinal epithelial cell renewal and migration induced by starvation.
Am. J. Physiol. 205: 868-872, 1963.

(10) Burton, K.:

A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estamation of deoxyribonucleic acid.
Biochem. J. 62: 315-323, 1956.

(11) Byron, J.W.:

Bone-marrow toxicity of metiamide.
Lancet 2: 1350, 1976.

(12) Chambon, P.:

Eukaryotic nuclear RNA polymerases.
Annual Review of Biochemistry 44: 613-638, 1975.

(13) Chandler, A.M.; Johnson, L.R.:

Pentagastrin-stimulated incorporation of ^{14}C-orotic acid into RNA of gastric and duodenal mucosa.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 141: 110-113, 1972.

(14) Chargaff, E.:

Initiation of enzymic synthesis of deoxyribonucleic acid by ribonucleic acid primers.
Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology 16: 1-24, 1976.

(15) Crean, G.P.; Marshall, M.W.; Rumsey, R.D.E.:
Parietal cell hyperplasia induced by the administration of pentagastrin to rats.
Gastroenterology 57: 147-155, 1969.

(16) Croft, D.N.:
Aspirin and the exfoliation of gastric epithelial cells. Cytological and biochemical observations.
Brit. Med. J. 2: 897-901, 1963.

(17) Deschner, E.; Lipkin, M.:
Study of human rectal epithelial cells in vitro. III. RNA, protein and DNA synthesis in polyps and adjacent mucosa.
J. Natl. Cancer Inst. 44: 175-185, 1970.

(18) Diamantstein, T.; Ulmer, A.:
Regulation of DNA synthesis by guanosine-5'-diphosphate, cyclic guanosine-3',5'-monophosphate, and cyclic adenosine-3',5'-monophosphate in mouse lymphoid cells.
Expl. Cell Res. 93: 309-314, 1975.

(19) Ellison, E.H.; Wilson, S.D.:
Further observations on factors influencing the symptomatology manifest by patients with the Zollinger-Ellison syndrome.
in: T.K. Shnitka, J.A.L. Gilbert and R.C. Harrison (eds.): "Gastric secretion, mechanisms and control". Pergamon Oxford: 363-373, 1967.

(20) Farber, E.; Baserga, R.:
Differential effects of hydroxyurea on survival of proliferating cells in vivo.
Cancer Res. 29: 136-139, 1969.

(21) Filosa, S.; Pictet, R.; Rutter, W.J.:
Positive control of cyclic AMP on mesenchymal factor controlled DNA synthesis in embryonic pancreas.
Nature 257: 702-705, 1975.

(22) Fleck, A.; Begg, D.:
The estimation of ribonucleic acid using ultraviolet absorption measurements.
Biochim. Biophys. Acta 108: 333-339, 1965.

(23) Frank, W.:
Cyclic 3',5'-AMP and cell proliferation in cultures of embryonic rat cells.
Expl. Cell Res. 71: 238-241, 1972.

(24) Giles, K.W.; Myers, A.:
An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid.
Nature 206: 93, 1965.

(25) Harbers, E.:
Die Nucleinsäuren.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1964.

(26) Hegglin:
Differentialdiagnose innerer Krankheiten, 12. Aufl.
Thieme, Stuttgart, 1972

(27) Johnson, L.R.:
Gut hormones on growth of gastrointestinal mucosa
in "Endocrinology of the Gut", ed. W.Y. Chey, F.P.Brooks, Therofare, New Jersey: Slack.

(28) Johnson, L.R.:
The trophic action of gastrointestinal hormones.
Gastroenterology 70: 278-288, 1976.

(29) Johnson, L.R.; Aures, D.; Hakanson, R.:
Effect of gastrin on the in vivo incorporation of ^{14}C-leucine into protein of the digestive tract.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 132: 996-998, 1969.

(30) Johnson, L.R.; Aures, D.; Yuen, L.:
Pentagastrin-induced stimulation of protein synthesis in the gastrointestinal tract.
Am. J. Physiol. 217: 251-254, 1969.

(31) Johnson, L.R.; Guthrie, P.D.:
Mucosal DNA synthesis: A short term index of the trophic action of gastrin.
Gastroenterology 67: 453-459, 1974.

(32) Johnson, L.R.; Guthrie, P.D.:
Secretin inhibition of gastrin-stimulated deoxyribonucleic acid synthesis.
Gastroenterology 67: 601-606, 1974.

(33) Johnson, L.R.; Guthrie, P.D.:
Effect of cholecystokinin and 16,16-dimethyl prostaglandin E_2 on RNA and DNA of gastric and duodenal mucosa.
Gastroenterology 70: 59-65, 1976.

(34) Johnson, L.R.; Guthrie, P.D.:
Stimulation of DNA synthesis by big and little gastrin (G-34 and G-17).
Gastroenterology 71: 599-602, 1976.

(35) Jost, J.-P.; Sahib, M.K.:
Role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in the induction of hepatic enzymes. II. Effect of $N^6,O^{2'}$-dibutyryl cyclic adenosine 3',5'-monophosphate on the kinetics of ribonucleic acid synthesis in purified rat liver nuclei.
J. Biol. Chem. 246: 1623-1629, 1971.

(36) Kahlson, G.; Rosengren, E.:
New approaches to the physiology of histamine.
Physiol. Rev. 48: 155-196, 1968.

(37) Kaplan, E.; Richman, H.G.:
Calcium stimulation of uridine-6-^{3}H incorporation into RNA of rat myocardium.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 142: 487-489, 1973.

(38) Kersten, H.:
Mechanism of action of mitomycins.
Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. XXXVIII/2, Chapter 34, 1975.

(39) Levine, R.A.:
The role of cyclic AMP in hepatic and gastrointestinal function.
Gastroenterology 59: 280-300, 1970.

(40) Lichtenberger, L.M.; Lechago, J.; Johnson, L.R.:
Depression of antral and serum gastrin concentration by food deprivation in the rat.
Gastroenterology 68: 1473-1479, 1975.

(41) Lipkin, M.:
Carbenoxolone sodium and the rate of extrusion of gastric epithelial cells.
in: Barow, J.H., Sullivan, F.M. (Eds): Carbenoxolone Sodium, p. 11-17, London:Butterworths 1970.

(42) Lipkin, M.:
Proliferation and differentiation of mucus containing cells in normal and deseased mucosa.
In: Proc. Intern. Congr. Gastroenterol., 9th, 1972, p. 500 c.

(43) Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J.:
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193: 265-275, 1951.

(44) Maley, G.F.; Maley, F.:
Nucleotide interconversions. V. Incorporation of deoxyadenylate into deoxyguanylate of deoxyribonucleic acid.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 5: 439-442, 1961.

(45) Mantsavinos, R.; Canellakis, E.S.:
Studies on the biosynthesis of DNA by cell-free extracts of mouse leukemic cells.
Cancer Res. 19: 1239-1243, 1959.

(46) Max, M.; Menguy, R.:
Influence of adrenocorticotropin, cortisone, aspirin, and phenylbutazone on the rate of exfoliation and the rate of renewal of gastric mucosal cells.
Gastroenterology 58: 329-336, 1970.

(47) Menguy, R.; Desbaillets, L.:
Influence of phenylbutazone on gastric secretion of mucus.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 125: 1108-1111, 1967.

(48) Menguy, R.; Masters, Y.F.:
Effects on gastric mucous secretion.
Surg. Gynec. Ostet. 120: 92, 1965.

(49) Munro, H.N.; Fleck, A.:
Measurement of nucleic acids in biological materials.
Analyst 91: 78-89, 1966.

(50) Overgaard-Hansen, K.; Klenow, H.:
On the mechanism of inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis in Ehrlich ascites tumor cells by deoxyadenosin in vitro.
Proc. nat. Acad. Sci. 47: 680-686, 1961.

(51) Pfleiderer, G.:
Eigenschaften und Aktivitätsbestimmungen von Enzymen.
In: Biochemisches Taschenbuch, H.M. Rauen, Springer-Verlag, 1964.

(52) Ragins, H.; Wincze, F.; Lin, S.M.; Dittbrenner, M.:
The origin and survival of gastric parietal cells in the mouse.
Anat. Record 162: 99-110, 1968.

(53) Ruoff, H.J.; Sewing, K.Fr.:
Cyclic nucleotides and gastric secretion.
In: Cyclic 3',5'-Nucleotides: Mechanisms of Action, Chapter 9, ed. by H. Cramer, J. Schultz, J. Wiley & sons, 1977.

(54) Ryan, W.L.; Heidrick, M.L.:
Inhibition of cell growth in vitro by adenosine-3',5'-monophosphate.
Science 162: 1484-1485, 1968.

(55) Schmidt, G.; Thannhauser, S.J.:
A method for the determination of desoxy-ribonucleic acid, ribonucleic acid, and phosphoproteins in animal tissues.
J. Biol. Chem. 161: 83-89, 1945.

(56) Seifart, K.H.:
Some characteristics of mammalian ribonucleic polymerase and factors influencing its activity.
In: Ribonculeic Polymerase and Transcription, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, London, 1970.

(57) Siebert, G.:
Enzymes of cancer nuclei.
Expl. Cell Res., Suppl. 9: 389-416, 1963.

(58) Sierakowska, H.; Shugar, D.:
Localization and function of nucleases.
Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology 20: 59-130, 1977.

(59) Steiner, M.; Bourges, H.R.; Freedman, L.S.; Gray, S.J.:
Effect of starvation on the composition of the small intestine in the rat.
Am. J. Physiol. 215: 75-77, 1968.

(60) Strunz, U.T.; Walsh, J.H.; Grossman, M.I.:
Stimulation of gastrin release in dogs by individual amino acids.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 157: 440-441, 1978.

(61) Webster, P.D.; Tyor, M.P.:
Effects of fasting and feeding on uridine-^{3}H incorporation into RNA by pancreas slices.
Am. J. Physiol. 212: 203-206, 1967.

(62) Widnell, C.C.; Tata, J.R.:
A procedure for the isolation of enzymically active rat-liver nuclei.
Biochem. J. 92: 313-317, 1964.

(63) Willems, G.:
Cell renewal in the gastric mucosa.
Digestion 6: 46-63, 1972.

(64) Willems, G.; Vansteenkiste, Y.; Smets, Ph.:
Effects of food ingestion on the cell proliferation kinetics in the canine fundic mucosa.
Gastroenterology 61: 323-327, 1971.

(65) Wilson, B.D.; Wright, R.L.:
Mechanism of TSH action: Effects of dibutyryl-cyclic AMP on RNA synthesis in isolated thyroid cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 41: 217-224, 1970.

(66) Yeomans, N.D.; St. John, D.J.B.; de Boer, W.G.R.M.:
Regeneration of gastric mucosa after aspirin-induced injury in the rat.
Am. J. Dig. Dis. 18: 773-780, 1973.

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Herren Professoren und Dozenten:

Pharmazeutische Chemie:	H. Auterhoff (Tübingen)
	R. Neidlein (Heidelberg)
	G. Schwenker (Heidelberg)
	H. Stamm (Heidelberg)
Pharmazeutische Technologie:	H. Vogt (Heidelberg)
Pharmazeutische Biologie:	H. Becker (Heidelberg)
Pharmakologie:	H.P.T. Ammon (Tübingen)
	F.H. Gross (Heidelberg)
	E. Hackenthal (Heidelberg)
Organische Chemie:	H. Musso (Karlsruhe)
Anorganische Chemie:	G. Fritz (Karlsruhe)
Physik:	W. Ruppel (Karlsruhe)
Hygiene:	Fr.W. Brauß (Heidelberg)

Allen Mitarbeitern des Pharmakologischen Instituts, die mich bei der Anfertigung der Dissertation unterstützten, danke ich an dieser Stelle sehr herzlich. Besonderer Dank gilt Herrn Dozent Dr. H.-J. Ruoff für die Hilfe bei der Planung des methodischen Teils der Arbeit und Frau G. Frisch für die Anfertigung der vorliegenden Zeichnungen und für die phototechnischen Arbeiten.

Lebenslauf

Am 31. Oktober 1951 wurde ich, Dietmar Müller, als Sohn des Ingenieurs Helmut Müller und seiner Ehefrau Alberta Müller, geb. Papi, in Genua/Italien geboren.
Nach 4 Jahren Volksschule besuchte ich ab Mai 1962 das Freihof-Gymnasium in Göppingen, wo ich im Juni 1970 das Abitur ablegte. Von August 1970 bis September 1971 war ich in der Markt-Apotheke in Göppingen als Apothekerpraktikant tätig. Ab dem Wintersemester 1971/72 studierte ich an der Universität Karlsruhe Pharmazie, wo ich im Oktober 1973 den 1. Teil der pharmazeutischen Prüfung bestand, ab dem Wintersemester 1973/74 an der Universität Heidelberg, wo ich im April 1975 den 2. Teil der pharmazeutischen Prüfung bestand. Von Mai 1975 bis April 1976 arbeitete ich in der Markt-Apotheke in Göppingen als Pharmaziepraktikant und legte am 29. April 1976 den 3. Teil der pharmazeutischen Prüfung ab.
Von Mai 1976 bis August 1978 arbeitete ich am Pharmakologischen Institut der Universität Tübingen unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. med. K.-Fr. Sewing an der vorliegenden Dissertation.